

# **Mechanismen der Immunmodulation durch die Genprodukte**

## **US11 und US28 des humanen Zytomegalievirus**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r   r e r u m   n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

(Dipl. Humanbiologin, Jana Droese)

(29.04.1976, Eisenach)

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Wolfgang Uckert

2. PD. Dr. Ralf Schüle

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2005

# Inhaltsverzeichnis

<b>0. Abkürzungen.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>5</b>
1.1. Das humane Zytomegalievirus.....	5
1.2. Das Chemokinsystem.....	8
1.3. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs).....	10
1.3.1. Die Struktur G-Protein-gekoppelter Rezeptoren.....	10
1.3.2. Molekulare Mechanismen der Aktivierung von GPCRs.....	11
1.3.3. Die Aktivierung intrazellulärer Signalwege durch Chemokinrezeptoren.....	13
1.3.4. Die Regulation der GPCR-Aktivität.....	15
1.4. Der viral-kodierte Chemokinrezeptor US28.....	18
1.5. Fragestellung.....	20
<b>2. Material.....</b>	<b>21</b>
2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	21
2.2. Bakterien.....	22
2.3. Plasmide.....	22
2.4. Oligonukleotide.....	23
2.5. Enzyme.....	23
2.6. Antikörper und Streptavidinkonjugate.....	24
2.7. Geräte und sonstige Materialien.....	25
2.8. Zellen.....	25
2.9. Adenoviren.....	25
2.10. Medien .....	26
2.11. Puffer.....	26
2.12. Mäuse.....	28
2.13. Peptid.....	28

<b>3. Methoden.....</b>	<b>29</b>
3.1. Nukleinsäure-Techniken.....	29
3.1.1. DNA-Amplifikation mit Hilfe der PCR.....	29
3.1.2. Agarosegelelektrophorese.....	29
3.1.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	30
3.1.4. Reinigungsmethoden für Nukleinsäuren.....	30
3.1.4.1. Phenol/Chloroform-Extraktion.....	30
3.1.4.2. Präzipitation von Nukleinsäuren mit Alkohol.....	30
3.1.5. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	31
3.1.6. Abspaltung von 5'-Phosphatresten durch alkalische Phosphatase.....	31
3.1.7. Ligation von DNA-Fragmenten.....	31
3.1.8. Herstellung transformationskompetenter Bakterien.....	32
3.1.9. Transformation.....	32
3.1.10. Isolierung von Plasmiden aus Bakterien.....	32
3.1.11. Präparative Plasmidisolierung.....	33
3.2. Einführung von Mutationen in cDNA mittels PCR.....	33
3.2.1. Mutagenese der C-terminalen Serinreste.....	33
3.2.2. Mutagenese der auf Tyrosinresten und Doppel-Leuzinresten basierenden AP-2 Adapterstellen sowie des Cysteinrestes C347 des US28-Rezeptors.....	34
3.2.3. Herstellung der US28 R129A-Mutante.....	35
3.3. Zellkultur.....	35
3.3.1 Kultivierung von Säugetierzelllinien.....	35
3.3.2 Transfektion von HEK293A-Zellen mit der Kalziumphosphat-Methode....	35
3.3.3 Transfektion von HEK293A-Zellen mit Fugene 6.....	36
3.3.4 Amplifikation und Aufreinigung von Adenoviren.....	36
3.3.5 Bestimmung des Adenovirustiters.....	37
3.3.6 Infektion von Säugetierzellen mit Adenovirus.....	37
3.4. Durchflußzytometrie.....	38
3.4.1. Nachweis von Oberflächenmolekülen.....	38
3.4.2. Nachweis intrazellulärer Epitope.....	38
3.5. T-Zellproliferationsassay.....	39
3.5.1. Ausreifung und Aufreinigung dendritischer Zellen aus Knochenmarkszellen.....	39
3.5.2. Präparation der Mausmilzzellen.....	39
3.5.3. Durchflußzytometrische Untersuchung der CD8 T-Zellproliferation.....	40

3.6.	Immunzytochemie und Immunfluoreszenzmikroskopie.....	40
3.7.	Metabolische Zellmarkierung mit Radioisotopen.....	41
3.7.1.	Metabolische Zellmarkierung mit [ <sup>35</sup> S] Methionin/Cystein.....	41
3.7.2.	Metabolische Zellmarkierung mit [ <sup>3</sup> H] Palmitat.....	41
3.8.	Zellextraktion mit Detergenz.....	41
3.9.	Immunpräzipitation.....	42
3.10.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	42
3.10.1.	Autoradiographie.....	42
3.11.	Immunblots.....	43
3.11.1.	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (Westernblot).....	43
3.11.2.	Immunfärbung von Proteinen.....	43
3.11.3.	Immundetektion von Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK) im Immunblot....	43
3.11.4.	Chemilumineszenz-Nachweis.....	44
3.12.	Bestimmung der NF-κB-Aktivierung mit Hilfe des Luziferase-Assays.....	44
3.13.	Internalisierung von [ <sup>125</sup> I]-markiertem RANTES.....	45
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
4.1.	Rolle des HCMV-kodierten US11-Proteins auf die DC-vermittelte Aktivierung von T-Zellen.....	47
4.1.1.	US11 vermindert die Expression von Maus-MHC-Klasse-I-Molekülen.....	47
4.1.2.	Die Expression des US11-Proteins in dendritischen Zellen vermindert die Expression von H2-D <sup>b</sup> -Molekülen.....	47
4.1.3.	Die Proliferation von zytotoxischen T-Zellen wird nicht durch US11- Expression in DCs beeinflusst.....	49
4.2.	Molekulare Untersuchungen des US28-Rezeptors.....	51
4.2.1.	US28 weist eine vorwiegend intrazelluläre Verteilung auf.....	51
4.2.2.	US28 vermittelt eine konstitutive Umlagerung von β-Arrestin-2-GFP in vesikuläre Strukturen.....	52
4.2.3.	US28 und β-Arrestin-2-GFP befinden sich in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten.....	53
4.2.4.	Herstellung der phosphorylierungsdefizienten Mutanten.....	55
4.2.5.	Die durch den US28-Rezeptor vermittelte Umlagerung von Arrestin-Molekülen wird durch die Phosphorylierung und das DRY-Motiv bestimmt.....	58
4.2.6.	Das DRY-Motiv reguliert die konstitutive und Liganden induzierte Signalleitung	



des US28-Rezeptors.....	59
4.2.6.1. Das DRY-Motiv des US28-Rezeptors reguliert die konstitutive Aktivierung von NF- $\kappa$ B.....	59
4.2.6.2. Das DRY-Motiv des US28-Rezeptors vermittelt die RANTES induzierte Aktivierung von MAPK.....	60
4.2.7. Die Internalisierung des US28-Rezeptors erfolgt unabhängig von $\beta$ -Arrestin und der konstitutiven Signalleitung.....	62
4.2.8. Dynamin reguliert die Internalisierung des US28-Rezeptors.....	63
4.2.8.1. Die Oberflächenexpression des US28-Rezeptors wird durch Dynamin reguliert.....	66
4.2.9. US28 befindet sich in der Detergenz-unlöslichen Zellfraktion.....	66
4.2.10. US28 und Caveolin 1 befinden sich in unterschiedlichen Kompartimenten.....	68
4.2.11. Die Internalisierung des US28-Rezeptors wird durch Filipin III und hyperosmolare Saccharose gehemmt.....	69
4.2.12. Die Internalisierung der phosphorylierungsdefizienten Mutante folgt den gleichen Wegen wie der wt Rezeptor.....	70
4.2.13. Die Endozytose des US28-Rezeptors wird unabhängig von der Palmitoylierung des C-Terminus reguliert.....	71
4.2.14. US28 kolokalisiert mit dem AP-2-Komplex.....	73
4.2.15. Das Dileuzinmotiv reguliert eine schnelle Internalisierung des US28-Rezeptors.....	74
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>77</b>
5.2. Bedeutung des US11-Proteins bei Aktivierung von CTLs.....	77
5.3. Die Internalisierung des US28-Rezeptors.....	80
5.2.1. Die Internalisierung des US28-Rezeptors wird nicht durch die Aktivierung von Signalwegen reguliert.....	84
5.3. Strukturelle Voraussetzungen der US28-Rezeptorendozytose.....	85
5.3.1. Die phosphorylierungsdefizienten Mutanten US28 S1-12A und US28 STA internalisieren über die gleichen Wege wie der wt Rezeptor.....	85
5.3.2. Bedeutung der Palmitoylierung des US28 Rezeptors für die Rezeptorinternalisierung.....	86
5.3.3. Ein C-terminales Dileuzin-Motiv reguliert die Kinetik der US28- Internalisierung.....	88
5.4. Die intrazelluläre Sortierung des US28-Rezeptors.....	89
5.5. US28 vermittelt eine konstitutive Umlagerung von Arrestin-Molekülen in Vesikel, die nicht mit dem Rezeptor kolokalisieren.....	90

5.6.	Strukturelle Voraussetzung des US28-Rezeptors für die Aktivierung intrazellulärer Signalwege.....	93
5.7.	Die Rolle des US28-Rezeptors während der HCMV Infektion.....	94
5.8.	Ausblick.....	95
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung/ Summary.....</b>	<b>97</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>101</b>

## **Danksagung**

## Abkürzungen

Ag	Antigen
AIDS	erworbene Immunschwächekrankheit ( <i>Acquired immune deficiency syndrome</i> )
Ak	Antikörper
AP	Adapterprotein
APC	Antigen-präsentierende Zellen ( <i>Antigen Presenting Cell</i> )
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
BSS	Hank's Salzlösung ( <i>Balanced Salt Solution</i> )
CCL, CCR	CC-Chemokinligand, -rezeptor
CCV	Clathrin umhüllte Vesikel ( <i>Clathrin Coated Vesicle</i> )
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CIP	<i>Calf Intestinal Phosphatase</i>
CK	Kaseinkinase ( <i>Casein Kinase</i> )
CMV	Zytomegalievirus ( <i>Cytomegalovirus</i> )
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten ( <i>cytotoxic T lymphocytes</i> )
CXCL, CXCR	CXC-Chemokinligand, -rezeptor
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol Dihydrochloridhydrat
DC	dendritische Zelle
ddH <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser (hier für: vollentsalztes Wasser)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EC	Enzymkommission ( <i>Enzyme Commission</i> )
ECL	verstärkte Chemilumineszenz ( <i>Enhanced Chemoluminescence</i> )
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
FACS	Durchflußzytometrie ( <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> )
FasL	Fas-Ligand
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FKN	Fractalkine (CX <sub>3</sub> CL1)
FKS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSH	follikelstimulierendes Hormon (Follitropin)
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor ( <i>Guaninnucleotide Exchange Factor</i> )

GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor ( <i>G-protein coupled receptor</i> )
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
GST	Glutathion-S-Transferase
HCMV	humanes Zytomegalievirus ( <i>Human Cytomegalovirus</i> )
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 ( <i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i> )
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JAK	Janus-Kinase
JNK	c-Jun-NH <sub>2</sub> -terminale Kinase
kDa	Kilodalton
KIR	Natürliche Killer-Zellen inhibierende Rezeptoren
LB	Luria Bertani-Medium
LCMV	Virus der lymphozytären Choriomeningitis
LFA	Lymphozyten Funktionsassoziiertes Antigen
LH	luteinisierendes Hormon
LIR	Leukozyten immunglobulinartige Rezeptoren
mAk	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MCMV	Zytomegalievirus der Maus ( <i>Murine Cytomegalovirus</i> )
MCP-1, -2, -3	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1, -2, -3</i> , (CCL2, -8, -7)
MDC	Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
MIP-1 $\alpha$ , - $\beta$	<i>Macrophage Inflammatory Protein-1 <math>\alpha</math>, -<math>\beta</math></i> (CCL3, -4)
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
$M_r$	relative Molekülmasse
MVB	Multivesikuläre Körperchen/ späte Endosomen ( <i>Multivesicular Bodies</i> )
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure ( <i>messenger Ribonukleic Acid</i> )
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor-<math>\kappa</math>B</i>
ORF	offener Leserahmen ( <i>Open Reading Frame</i> )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>Phosphat Buffered Saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PE	R-Phycoerythrin
PI3K	Phosphatidyl-Inosit-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase

PTX	Pertussis Toxin
Pyk	Prolin-reiche Tyrosinkinase
RANTES	<i>Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted</i> (CCL5)
RCMV	Ratten-Zytomegalievirus ( <i>Rat Cytomegalovirus</i> )
RLU	relative Einheit der Luziferase-Enzymaktivität ( <i>Relative Luciferase Unit</i> )
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
S.D.	Standardabweichung ( <i>Standard Deviation</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>Sodium Dodecylsulfate</i> )
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TAP	Transporter assoziiert mit Antigenprozessierung
TEMED	N,N,N',N-Tetramethylethylendiamin
TGN	Trans-Golgie-Netzwerk
$T_m$	Schmelzpunkt der DNA
TNF	Tumornekrose-Faktor
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSH	thyreoideastimulierendes Hormon (Thyreotropin)
UL	einmaliger langer ( <i>unique long</i> ) Sequenzabschnitt des HCMV-Genoms
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
US	einmaliger kurzer ( <i>unique short</i> ) Sequenzabschnitt des HCMV-Genoms

#### Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren:

A	Ala	Alanin	I	Ile	Isoleucin	R	Arg	Arginin
C	Cys	Cystein	K	Lys	Lysin	S	Ser	Serin
D	Asp	Asparaginsäure	L	Leu	Leucin	T	Thr	Threonin
E	Glu	Glutaminsäure	M	Met	Methionin	V	Val	Valin
F	Phe	Phenylalanin	N	Asn	Asparagin	W	Trp	Tryptophan
G	Gly	Glycin	P	Pro	Prolin	Y	Tyr	Tyrosin
H	His	Histidin	Q	Gln	Glutamin			

# 1. Einleitung

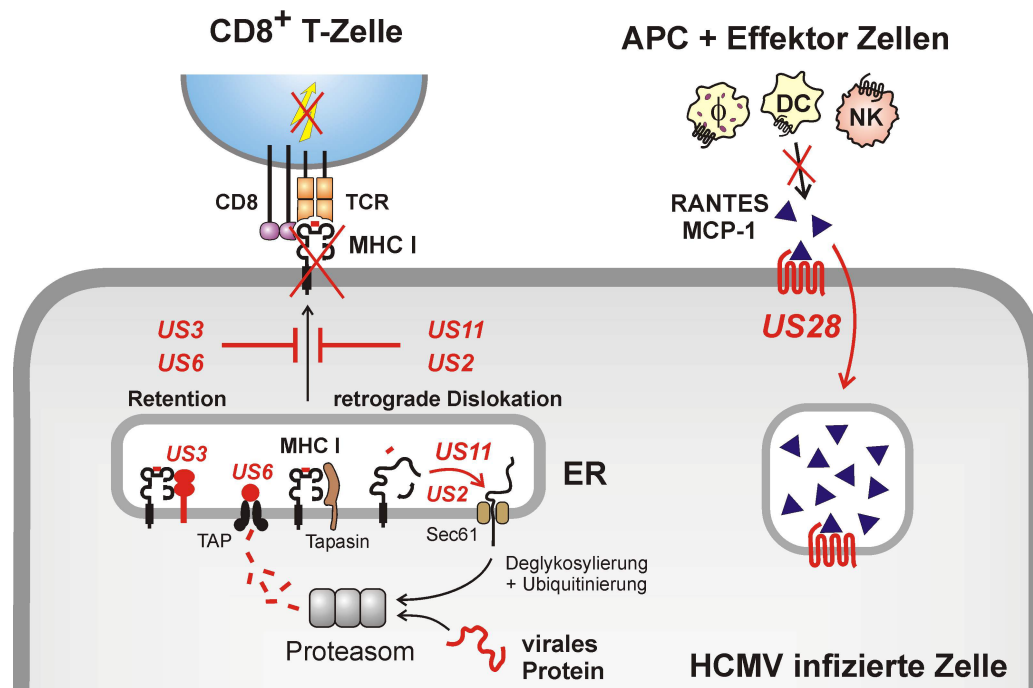
## 1.1. Das humane Zytomegalievirus

Das humane Zytomegalievirus (HCMV) gehört zur Gruppe der  $\beta$ -Herpesviren. Charakteristisch für Herpesviren sind ein doppelsträngiges DNA-Genom und ihre Eigenschaft, nach der primären Infektion eine latente Infektion des Wirtes zu entwickeln. In diesem Stadium, der Latenz, kann in Geweben des Wirtes zwar Virus-DNA, aber keine infektiösen Viruspartikel nachgewiesen werden (Banks und Rouse, 1992).

Das HCMV infiziert verschiedene Zelltypen wie Endothel- und Epithelzellen, Fibroblasten, neuronale Zellen, glatte Muskelzellen sowie Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen (Mocarski und Courcelle, 2001; Jahn *et al.*, 1999; Raftery *et al.*, 2001; Riegler *et al.*, 2000). Aber nur Monozyten und  $CD33^+/CD34^+$  Vorläuferzellen beherbergen HCMV in seiner latenten Form (Beisser *et al.*, 2001; Goodrum *et al.*, 2002; Prösch *et al.*, 1999; Soderberg-Naucler *et al.*, 2001; Taylor-Wiedeman *et al.*, 1991).

Eine Infektion durch das HCMV verläuft bei immunkompetenten Patienten meist asymptomatisch. Im Gegensatz dazu führt die Infektion oder die Reaktivierung des HCMV in immungeschwächten Menschen zu schweren Erkrankungen. Bei einer pränatalen Infektion kann es je nach Entwicklungsstadium des Fötus zu Schädigungen des Gehirns, der Augen oder des Gehörs kommen. Viele Kinder sterben auch *in utero* oder nach der Geburt. Bei AIDS-Patienten gehört die Infektion mit HCMV zu den am häufigsten vorkommenden opportunistischen viralen Infektionen, die mit einer schweren Lungenentzündung oder Netzhautentzündung einhergeht. Des weiteren zeigen epidemiologische Studien, daß HCMV positive Individuen ein über zweifach erhöhtes Risiko besitzen, vaskuläre Erkrankungen, wie koronare Herzkrankheiten, zu entwickeln (Horvath *et al.*, 2000).

Das HCMV besitzt mit über 230 Kilobasen, die für über 200 Proteine kodieren, das größte Genom aller bisher bekannten Herpesviren. Das Genom des HCMV besteht aus einer langen und einer kurzen (UL unique long, US unique short) einmalig vorhandenen Genomregion, die an ihren jeweiligen Enden von Wiederholungseinheiten flankiert wird. Nach der Adsorption des Virus an die Zielzelle fusioniert die Virushülle mit der Zellmembran, das Kapsid wird in die Zelle entlassen, zum Kern transportiert und das Genom dort freigesetzt. Die Replikation des Virus erfolgt im Zellkern. Dort werden zunächst die sehr frühen Gene (*immediate early*,



**Abb. 1.1. HCMV-Mechanismen zur Unterwanderung der menschlichen Immunantwort.** Gezeigt ist eine Auswahl von zwei Mechanismen. HCMV-kodierte Proteine sind durch rote Färbung hervorgehoben

IE) mit Hilfe der RNA-Polymerase des Wirtes transkribiert, die als Transaktivatoren für die Expression der E-Gene (*early*) wirken. Die Transkription der E-Gene erfolgt 4-24 h nach der Infektion. E-Gene kodieren für Proteine, die an der viralen DNA-Replikation, der DNA-Reparatur oder der Manipulation des wirtseigenen Immunsystems beteiligt sind. Die Transkription der L-Gene (*late*) beginnt 24-36 h nach der Infektion. Sie kodieren für Strukturproteine, die an dem Zusammenbau der Virione beteiligt sind.

Frühe Studien an Mäusen zeigten, daß zytotoxische T-Zellen an der Erkennung und Beseitigung MCMV-infizierter Zellen beteiligt sind, da der Verlust dieser Zellen zu einer Reaktivierung und Ausbreitung des Virus führte (Jonjic *et al.*, 1990). T-Zellen erkennen mit Hilfe ihres T-Zellrezeptors virale Peptide, die über MHC-Moleküle an der Oberfläche infizierter Zellen präsentiert werden. Nach ihrer Aktivierung vermitteln dann zytotoxische T-Zellen durch die Ausschüttung von Mediatoren den Tod der infizierten Zellen.

Voraussetzung für die Bereitstellung viraler Peptidfragmente ist der proteasomale Abbau viraler Proteine (Reits *et al.*, 2000; Schubert *et al.*, 2000; Yewdell *et al.*, 1999). Die aus dem Abbau hervorgegangenen Proteinfragmente werden durch den TAP-Transporter ins endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert, wo sie unter Mitwirkung von Tapasin mit MHC-Klasse-I-Molekülen assoziieren (Pamer und Cresswell, 1998; Rock *et al.*, 2002; Yewdell *et al.*, 1999; Yewdell und Bennink, 2001).

Das HCMV-Genom kodiert für vier Proteine, die in diesen Prozeß eingreifen (Abb.1.1). Die durch US2 und US11 kodierten Proteine bewirken einen retrograden Transport neu synthetisierter MHC-Klasse-I-Moleküle aus dem ER in das Zytosol, wo sie ubiquitiniert und proteasomal abgebaut werden (Wiertz *et al.*, 1996a; Wiertz *et al.*, 1996b). Die Expression des US3-Proteins verhindert den Transport der zusammengebauten MHC-Klasse-I-Moleküle an die Zelloberfläche und vermittelt daher ihre Anreicherung in einem ER-assoziierten Kompartiment (Ahn *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1996). Das US6-Gen kodiert für ein Transmembranprotein, das im ER-Lumen an den TAP-Transporter bindet und dadurch die Einschleusung der zu präsentierenden Peptide verhindert (Ahn *et al.*, 1996; Ahn *et al.*, 1997; Hengel *et al.*, 1996).

Eine verminderte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen durch die HCMV-kodierten Proteine würde die infizierte Zelle zwar vor einer T-Zell-vermittelten Lyse schützen, aber eine Lyse durch NK-Zellen begünstigen. Die Fähigkeit von NK-Zellen Herpesvirus-Infektionen zu kontrollieren, ist durch Patienten mit einem Mangel an NK-Zellen belegt, da diese eine hohe Anfälligkeit für Herpesvirusinfektionen besitzen (Biron *et al.*, 1989). In der „missing self“-Hypothese postulierten Ljunggren und Karre bereits 1990, daß NK-Zellen Zellen mit einer verminderten Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen erkennen und zerstören (Ljunggren und Karre, 1990). NK-Zellen besitzen an ihrer Oberfläche MHC-Klasse-I-Moleküle-bindende Rezeptoren, die sogenannten „Killer-Zellen-inhibierenden Rezeptoren“ (KIR) und die „Leukozyten immunglobulinartigen Rezeptoren (LIR) (Cosman *et al.*, 1997; Moretta *et al.*, 2001). Die Bindung von KIR oder LIR an MHC-Klasse-I-Moleküle bewirkt in den NK-Zellen eine Hemmung ihrer zytotoxischen Maschinerie und verhindert damit die Lyse der Zielzelle. HCMV-infizierte Zellen exprimieren an ihrer Oberfläche die Proteine UL18 und UL40, welche die inhibierenden Rezeptoren der NK-Zellen binden (Fahnestock *et al.*, 1995; Ulbrecht *et al.*, 2000). Es wird angenommen, daß die Expression von UL18 und UL40 für den Schutz HCMV-infizierter Zellen vor NK-Zellen verantwortlich sind. Interessanterweise wird die Expression von UL18, das humanen MHC-Klasse-I-Molekülen homolog ist, nicht von US2, US3, US6, und US11 inhibiert (Park *et al.*, 2002).

Ein neuartiger Mechanismus, NK-Zell-Aktivität zu hemmen, ist kürzlich für das HCMV-kodierte Protein UL16 beschrieben worden. Dabei verhindert UL16 eine Aktivierung von NK-Zellen, indem es Liganden des aktivierenden Rezeptors NKGD bindet und somit sterisch eine Bindung von NKGD an seine Liganden verhindert (Odeberg *et al.*, 2003; Rolle *et al.*, 2003; Vales-Gomez *et al.*, 2003).



Einen weiteren interessanten Zusammenhang stellt die Beobachtung dar, daß der HCMV-kodierte Chemokinrezeptor US28 für das Entfernen von Chemokinen aus der Umgebung infizierter Zellen verantwortlich ist (Billstrom *et al.*, 1999; Bodaghi *et al.*, 1998). Es wurde vermutet, daß das Virus durch diesen Mechanismus die Chemokin-vermittelte Rekrutierung von Immunzellen an den Ort der viralen Infektion verhindert.

### 1.2. Das Chemokinsystem

Seit Beschreibung des ersten Chemokins im Jahr 1987, dem neutrophilen Aktivierungs-Peptid-1 (NAP-1, später umbenannt in IL8, CXCL8), ist die Anzahl der bekannten Chemokine auf knapp 50 und die Zahl ihrer Rezeptoren auf 19 angestiegen (Proudfoot *et al.*, 2003; Yoshimura *et al.*, 1987). Chemokine sind chemotaktisch wirkende Zytokine, die über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) Signalwege aktivieren und dadurch eine Zielsteuerung von Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten bewirken. Chemokine und ihre Rezeptoren sind zudem am Aufbau sekundärer lymphatischer Organe, an der Organ- und Embryonalentwicklung (Doitsidou *et al.*, 2002; Tachibana *et al.*, 1998), an der Wundheilung (Gillitzer und Goebeler, 2001), an der Angiogenese (Bernardini *et al.*, 2003) sowie vermutlich an der Metastasierung von Tumoren (Balkwill, 2003) beteiligt.

Ein strukturelles Merkmal der meisten Chemokine ist die Existenz von vier Cysteinresten, von denen jeweils der erste und der dritte sowie der zweite und vierte über intramolekulare Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Es können vier Gruppen von Chemokinen hinsichtlich der Anordnung der ersten beiden Cysteinreste am N-Terminus unterschieden werden. Bei den Mitgliedern der CXC-Familie sind die beiden konservierten Cysteinreste durch eine Aminosäure getrennt, während diese trennende Aminosäure bei den Mitgliedern der CC-Familie fehlt. Das CX<sub>3</sub>C-Chemokin Fraktalkine ist der einzige Vertreter der dritten Gruppe und zeichnet sich durch drei Aminosäuren zwischen den N-terminal gelegenen Cysteinresten aus. Demgegenüber besitzen Lymphotactin- $\alpha$  und - $\beta$  (C-Chemokin) als alleiniger Vertreter der vierten Gruppe nur zwei der vier konservierten Cysteinreste.

Funktionell wird zwischen inflammatorischen und homöostatischen Chemokinen unterschieden (Abb.1.2). Die inflammatorischen Chemokine werden nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen oder nach Pathogenkontakt von Zellen (z.B. Makrophagen) am Ort einer Entzündung freigesetzt. Diese Gruppe von Chemokinen bewirkt die Rekrutierung von Effektorzellen, wie z.B. neutrophilen Granulozyten, aktivierten T-Zellen oder NK-Zellen, an den Ort der Entzündung. Ferner werden unreife dendritische Zellen (DC) angelockt,

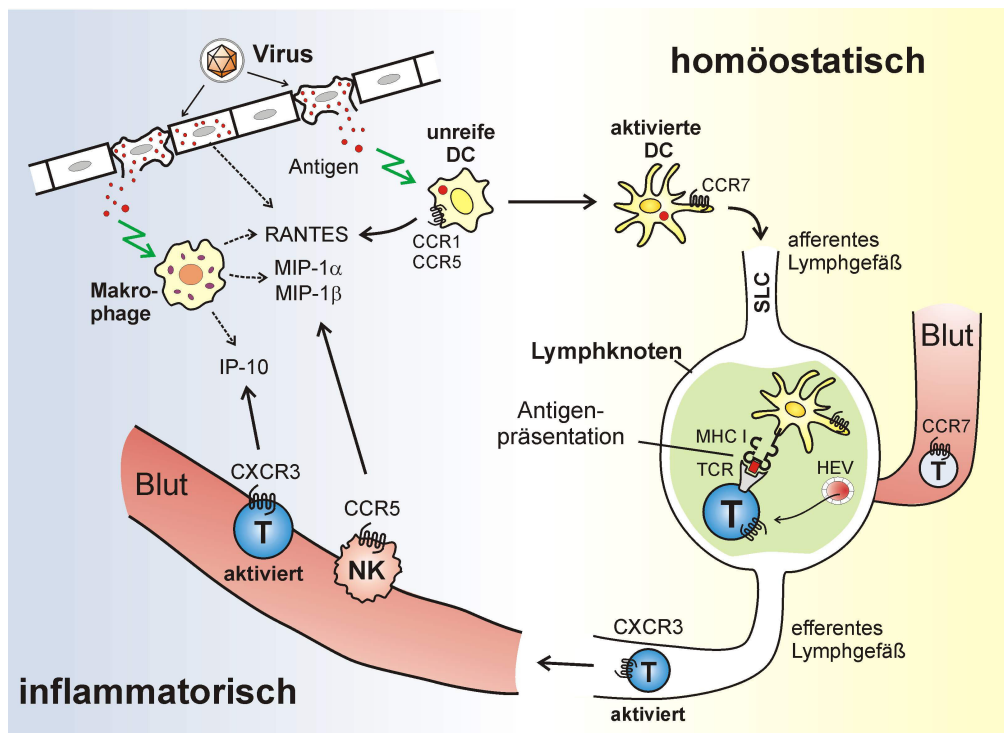


Abb. 1.2. Bedeutung der inflammatorischen und homöostatischen Chemokine in der Immunantwort.

T: T-Zelle, NK: NK-Zelle, HEV: Hohe endotheliale Venolen. (Modifiziert nach Luster, 2002).

die Rezeptoren (CCR1 und CCR5) der inflammatorischen Chemokine MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  und RANTES exprimieren. Am Ort der Infektion nehmen die unreifen DCs Antigene auf und werden aktiviert. Die Aktivierung führt zu einer Reifung und Differenzierung der DCs, was sie zu hoch effektiven antigenpräsentierenden Zellen macht. In diesem Stadium exprimieren sie den homöostatischen Chemokinrezeptor CCR7. Homöostatische Chemokine regulieren insbesondere die Organsteuerung von Immunzellen in sekundäre lymphatische Organe. So werden aktivierte DCs mittels des CCR7-Liganden SLC über afferente Lymphgefäße in drainierende Lymphknoten dirigiert. Die Rekrutierung von naiven T-Zellen ist ebenfalls von CCR7 abhängig. In den Lymphknoten werden T-Zellen durch den Kontakt mit antigenpräsentierenden DCs aktiviert, sie differenzieren zu Effektorzellen und gelangen über die Blutbahn mit Hilfe der inflammatorischen Chemokine an Orte der Entzündung (Abb.1.2).

Ein besonderes Interesse erlangten die humanen Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 durch ihre Funktion als Korezeptoren für den Eintritt von HIV in ihre Zielzellen. Die Rezeptoren bilden zusammen mit dem CD4-Molekül und dem Hüllprotein des HIV, gp120, einen tri-molekularen Komplex, der die Fusion des HI-Virus mit der Plasmamembran durch gp41 vermittelt (Berger *et al.*, 1999; Wyatt und Sodroski, 1998). Die besondere Bedeutung des Chemokinrezeptors CCR5 bei HIV-Infektionen wird durch die Beobachtung unterstützt, daß

eine natürlich vorkommende Deletion von 32 Basenpaaren im CCR5-Gen homozygote Träger dieser Mutation vor HIV-1-Infektion schützt (Dean *et al.*, 1996; Samson *et al.*, 1996).

Bis heute sind über 30 viral-kodierte Chemokine und Chemokinrezeptoren bekannt (Murphy, 2001). Sie wurden vorwiegend in Herpesviren gefunden und können sowohl agonistisch als auch antagonistisch wirken. So vermittelt das vCXC1-Molekül (ORF UL146) des HCMV nach Bindung an CXCR2 in neutrophilen Granulozyten eine Ausschüttung von intrazellulären Kalzium-Ionen sowie die Migration und Degranulation CXCR2 tragender Zellen (Penfold *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu blockiert das vMIPII, das von HHV8 kodiert wird, die Signalleitung über CCR1, CCR2, CCR3, CCR5 und CXCR4 sowie eine CCR5-vermittelte Infektion mit HIV (Kledal *et al.*, 1997).

Schließlich wurden unter den Herpesviren zahlreiche Chemokinrezeptor-Homologe identifiziert, die an die Chemokine des Wirtes binden und die Migration der infizierten Zellen sowie die Aktivierung intrazellulärer Signalwege vermitteln. Über ihre Funktion während der Virusinfektion *in vivo* kann derzeit nur spekuliert werden (siehe Übersichten in Alcamí, 2003). Besonders gut untersucht ist der vGPCR (ORF 74) des Kaposi-Sarkom assoziierten Herpesvirus (HHV8). Dieser Rezeptor ist konstitutiv aktiv und vermittelt Läsionen in immunkompetenten transgenen Mäusen, die dem histologischen Bild von virusinduzierten Kaposi-Sarkomen des Menschen entsprechen (Arvanitakis *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2000). Vom MCMV kodierten Chemokinrezeptor M33 ist bekannt, daß er für die Infektiosität und Replikation des Virus *in vivo* notwendig ist, da er die Ausbreitung des Virus in die Speicheldrüsen gewährleistet (Davis-Poynter *et al.*, 1997).

### 1.3. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)

#### 1.3.1. Die Struktur G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

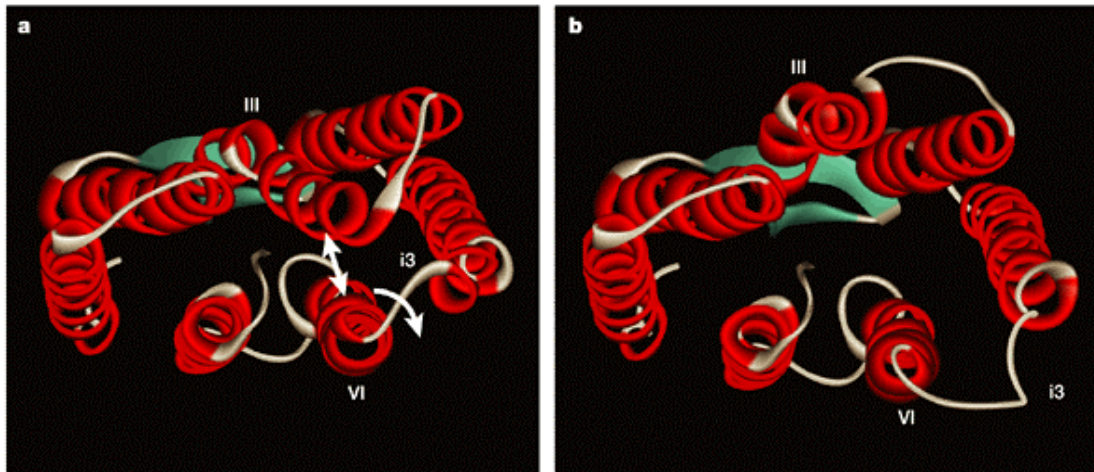
Strukturell gehören die Chemokinrezeptoren zu der größten Familie membranständiger Rezeptoren, den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Mit über 1000 Vertretern kodieren die GPCRs für ca. 3 % der menschlichen Strukturgene (Marinissen and Gutkind, 2001). Allen Rezeptoren gemeinsam ist, daß sie die Aktivierung heterotrimerer G-Proteine regulieren. Strukturell besitzen alle GPCRs sieben Transmembrandomänen, die durch alternierende intrazelluläre und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Die meisten Rezeptoren können in drei Hauptfamilien eingeteilt werden (siehe Übersicht in Gether, 2000). Die

Gruppe der Rhodopsin-verwandten Rezeptoren (Familie A) bildet dabei die größte Untergruppe. Zu ihnen gehören neben Rhodopsin, den  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren, Angiotensin- und Vasopressinrezeptoren auch die Gruppe der Chemokinrezeptoren, darunter der US28-Rezeptor. Ihre Mitglieder zeichnen sich durch ein hoch konserviertes E/DRY-Motiv auf der zytoplasmatischen Seite der dritten Transmembrandomäne und eine Palmitoylierungsstelle am C-Terminus aus, die möglicherweise die Ausbildung einer vierten intrazellulären Schleife ermöglicht.

Charakteristisch für die Familie der Glucagonrezeptor-ähnlichen Rezeptoren (B-Familie) ist ein über 100 Aminosäuren langer N-Terminus, der viele Cysteinreste enthält, die vermutlich über Disulfidbrücken verbunden sind. Die Rezeptoren der C-Familie (z.B. GABA-Rezeptor), zeichnen sich durch einen sehr langen N-Terminus (500-600 Aminosäuren) aus.

### 1.3.2. Molekulare Mechanismen der Aktivierung von GPCRs

Die Aktivierung von GPCRs zieht eine Änderung der Rezeptorkonformation nach sich, die neben der Aktivierung von G-Proteinen ebenfalls eine Interaktion mit anderen Adaptermolekülen, die an der Signalleitung und Endozytose des Rezeptors beteiligt sind, ermöglicht. Dabei vermittelt die Bindung eines Agonisten einen aktivierten Konformationszustand, während die Bindung eines Antagonisten eine inaktive Konformation stabilisiert. Diese Annahme wird durch spektroskopische Untersuchungen am  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor und am Rhodopsin gestützt, die nach der Aktivierung des Rezeptors eine relative Bewegung der Transmembrandomänen III und VI voneinander vorhersagen (Abb. 1.3) (Chalmers und Behan, 2002; Farrens *et al.*, 1996; Gether *et al.*, 1997). Dadurch wird die Konformation der angrenzenden G-Protein-bindenden intrazellulären Schleifen zwei und drei verändert. Zusammen mit der Protonierung der Asparaginsäure im DRY-Motiv am Übergang der dritten Transmembrandomäne wird diese Konformationsänderung als Ursache für die Dissoziation des G-Proteins von seinem Rezeptor angesehen (Gether, 2000). Folglich ist es möglich, daß Veränderungen der Aminosäurekomposition in konformationell wichtigen Bereichen eine konstitutive Aktivierung der GPCRs bewirken können. Interessanterweise wurde dabei das DRY-Motiv in vielen GPCRs als ein bedeutendes Strukturmotiv identifiziert, um die aktive Konformation zu erhalten. Eine besondere Bedeutung scheint dabei die Asparaginsäure zu besitzen, da die Mutation dieser Aminosäure im Rhodopsin (Cohen *et al.*, 1993), im  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor



**Abb. 1.3. Die inaktive und aktive Konformation eines GPCRs.** Das Bild basiert auf der Kristallstruktur von Rhodopsin und zeigt eine Aufsicht auf den GPCR von der zytoplasmatischen Seite. **(a)** Die inaktive Konformation eines GPCRs. **(b)** Der aktive Zustand des GPCRs. Der Wechsel vom inaktiven zum aktiven Zustand verändert den Abstand zwischen der III. und VI. Transmembrandomäne. Dabei wird die VI. Transmembrandomäne herausgedreht, was mit einer Konformationsänderung der zweiten und dritten intrazellulären Schleife einhergeht. (aus Chalmers und Behan, 2002)

(Rasmussen *et al.*, 1999) und im M1-muskarinergen Rezeptor (Lu *et al.*, 1997) eine konstitutive Aktivität induzierte. Ebenfalls bewirkte ein Austausch der Asparaginsäure im konservierten DRY-Motiv zu Valin eine konstitutive Aktivierung des CXCR2-Rezeptors, ähnlich dem konstitutiv aktiven Kaposi-Sarkom-assoziierten Rezeptor ORF74, der ein solches VRV-Motiv besitzt (Burger *et al.*, 1999).

Zusätzlich zu dem DRY-Motiv konnten ebenfalls weitere strukturelle Bereiche ermittelt werden, die eine konstitutive Aktivierung des Rezeptors bewirken. Untersuchungen am C5a-Rezeptor identifizierten Mutationen von Aminosäuren in bestimmten Abschnitten der III. und VI. Transmembrandomäne als sensible Bereiche für eine konstitutive Aktivität des Rezeptors (Geva *et al.*, 2000). Kürzlich wurde durch eine Analyse chimärer C-terminaler Rezeptorkonstrukte der C-Terminus des US28-Rezeptors als strukturelles Merkmal seiner konstitutiven Aktivität identifiziert (Waldhoer *et al.*, 2003).

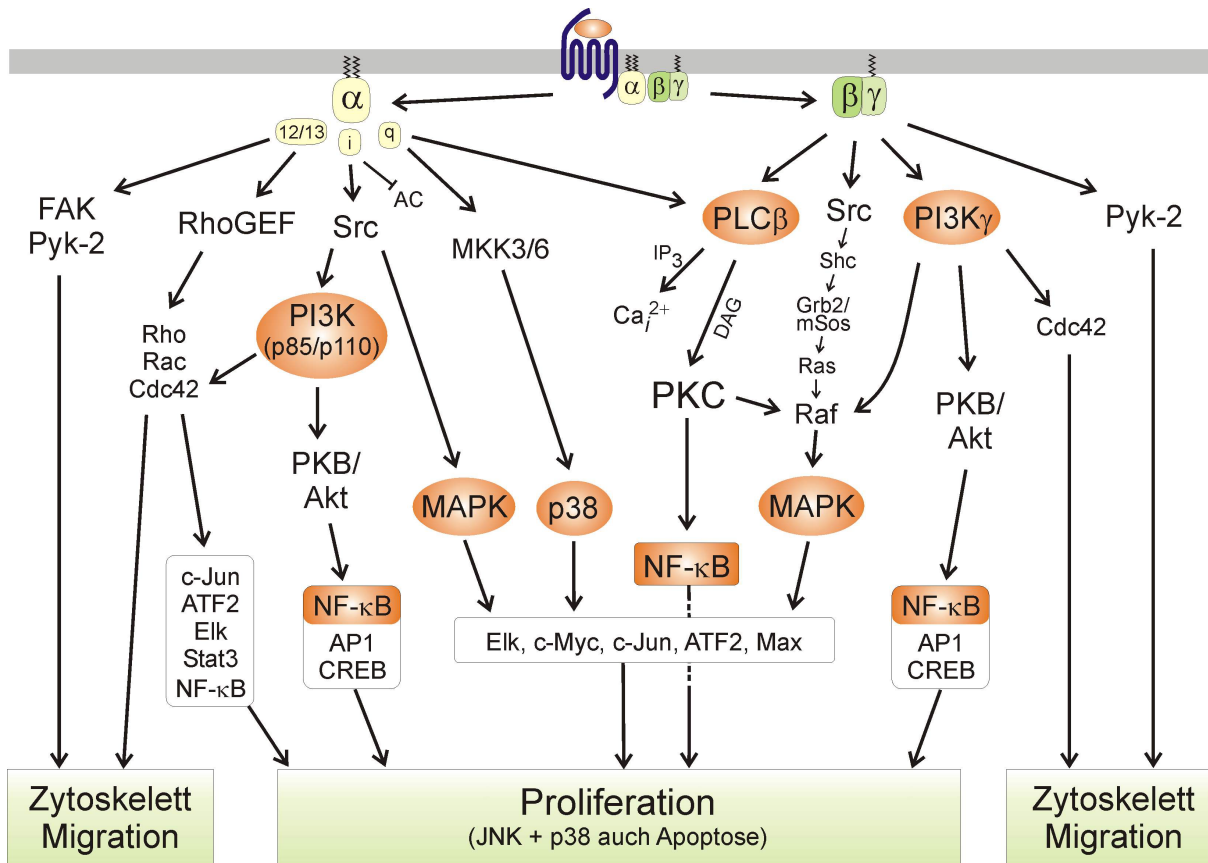
Untereinheit	Toxinsensitivität	Funktion
$G\alpha_s$	Choleratoxin	Aktivierung der Adenylatzyklase
$G\alpha_i$	Pertussistoxin	Hemmung der Adenylatzyklase; Aktivierung von PI3K $\gamma$
$G\alpha_q$		Aktivierung der PLC, PKC
$G\alpha_{12}$		Aktivierung von Aktinpolymerisation und der fokalen Adhäsion, Induktion der NO-Synthetase
$G\beta\gamma$		Aktivierung der GRK, PLC- $\beta$ , src-Familie von Tyrosinkinasen, PI3K

**Tabelle 1. 1.** Die G-Proteinfamilien und eine Auswahl ihrer Effektoren. Choleratoxin von *Vibrio cholera* verlängert die Aktivität der  $G\alpha_s$ -Untereinheit. Pertussistoxin von *Bordetella pertussis* hemmt spezifisch die Signalleitung über  $G\alpha_i$ -Proteine. GRK: G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase, PI3K Phosphatidyl-Inosit-3-Kinase, PLC Phospholipase C, NO Stickstoffmonoxid.

### 1.3.3. Die Aktivierung intrazellulärer Signalwege durch Chemokinrezeptoren

GPCRs vermitteln die Aktivierung verschiedener Signalwege durch ihre Kopplung an intrazellulär gebundene G-Proteine. Diese setzen sich aus einer  $\alpha$ -Untereinheit und einem  $\beta\gamma$ -Dimer zusammen. Anhand ihrer  $\alpha$ -Untereinheit werden G-Proteine in vier Klassen ( $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_{12}$ ) unterteilt. Die Bindung eines Agonisten an den GPCR katalysiert über eine Konformationsänderung des Rezeptors die Aktivierung seines G-Proteins. Dabei wirkt der GPCR als Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) und vermittelt eine Konformationsänderung der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins, die zum Austausch von GDP durch GTP führt. Im Anschluß daran dissoziiert die GTP-gebundene  $\alpha$ -Untereinheit vom Rezeptor sowie von der  $\beta\gamma$ -Untereinheit. Die aktivierten  $\alpha$ - und  $\beta\gamma$ -Untereinheiten regulieren im Anschluß unabhängig voneinander die Aktivität verschiedener Signalmoleküle, wie der Phospholipase  $A_2$ , PI3K, RhoGEFs, G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinasen (GRKs) und Src-Kinasen sowie verschiedene Formen der Adenylatzyklase und der Phospholipase C (PLC) (Übersichten in Knall und Johnson, 1998; Marinissen und Gutkind, 2001; Morris und Malbon, 1999) (Abb.1.4).

Allgemein werden durch die Stimulation von Chemokinrezeptoren Signalwege aktiviert, die die Migration, die Proliferation oder die Aktivierung von Zellen regulieren. Für eine



**Abb. 1.4. Aktivierung intrazellulärer Signalwege durch Chemokinrezeptoren.** Die Abbildung zeigt eine Auswahl der durch Chemokinrezeptoren aktivierten Signalwege. Schlüsselmoleküle sind orange unterlegt, die verbindenden Pfeile stehen sowohl für direkte als auch indirekte Interaktionen zwischen den beteiligten Partnern (Mokros, 2004).

gerichtete Migration Chemokinrezeptor-tragender Zellen wird bei einer großen Anzahl von Rezeptoren eine Kopplung an  $G\alpha_i$ -Proteine benötigt. Bei diesen Rezeptoren kann die Chemotaxis durch die spezifische Hemmung der  $G\alpha_i$ -Untereinheit mittels Pertussistoxin verhindert werden. Für die humanen Chemokinrezeptoren CXCR1, CCR2, CCR5 und CXCR4 ist eine solche Kopplung an G-Proteine des  $G\alpha_i$ -Typs beschrieben (Damaj *et al.*, 1996; Mellado *et al.*, 1998; Rodriguez-Frade *et al.*, 1999; Vila-Coro *et al.*, 1999).

Die Rho-Familie kleiner GTP-asen (Rho, Rac, Cdc42) stellt einen Signalweg dar, der die Zellmigration vermitteln kann (Schmitz *et al.*, 2000). Alternativ aktivieren die Chemokine RANTES und SDF-1 die Tyrosinkinasen FAK und Pyk-2 in T-Zellen sowie in hämatopoetischen Vorläuferzellen (Bacon *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2000). Beide Moleküle sind Bestandteile der fokalen Adhäsions-Komplexe, die neben der Regulation der Zellmigration auch an der Kontrolle des Zellwachstums beteiligt sind (Schlaepfer *et al.*, 1999).

Die PI3K $\gamma$  konnte als weiteres Molekül von zentraler Bedeutung für die Induktion der Chemotaxis identifiziert werden, da Untersuchungen an PI3K $\gamma$ -defizienten Mäusen ergaben, daß die Leukozyten dieser Mäuse eine erheblich verminderte Fähigkeit zur Chemotaxis zeigten (Hirsch *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2002). Die Mitglieder der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) ERK 1/2 und p38 sind ebenfalls durch die Stimulation der Phospholipase A2 (PLA2) an der Regulation der Chemotaxis beteiligt (Gutkind, 2000). Dabei führt die Aktivierung der Phospholipase A2 zur Freisetzung von Arachidonsäure und Phospholipiden, die im weiteren Verlauf die Aktin-Polymerisierung regulieren (Hill und Treisman, 1995).

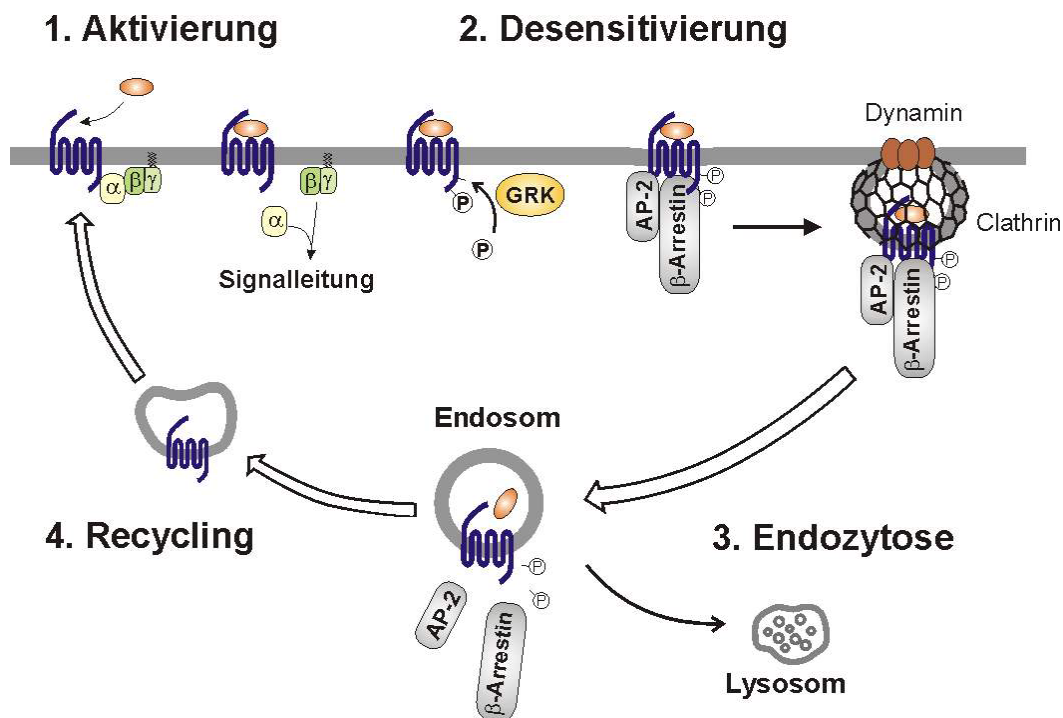
Neben einer Auslösung der Migration sind einige der bereits genannten Moleküle ebenfalls an einer Induktion proliferativer Signalwege oder der Verhinderung von Apoptose beteiligt. Durch die PI3K $\gamma$  wird die Aktivität der Proteinkinase B (PKB/Akt) reguliert. PKB/Akt verhindert zum einen Apoptose, indem es die Komponente Bad des Bad/Bcl-X<sub>L</sub>-Komplexes phosphoryliert und ist weiterhin an einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B beteiligt. Auch die PKC ist in der Lage die Aktivierung von NF- $\kappa$ B zu vermitteln, der an der Regulation der Zellproliferation, dem Schutz vor Apoptose sowie der Transkription immunmodulatorischer Moleküle beteiligt ist (Downward, 1998; May und Ghosh, 1998). Proliferative Signale werden ebenfalls durch die MAPK-Mitglieder ERK 1/2, p38 und c-Jun vermittelt, die eine Transkription verschiedener Gene regulieren.

Neben einer G-Protein-abhängigen Aktivierung von Signalwegen (Abb.1.4) sind zwei G-Protein-unabhängige Mechanismen der Signalleitung durch GPCRs bekannt. Zum einen können die Chemokinrezeptoren CXCR4, CCR2 und CCR5 direkt Januskinasen (JAK) binden und damit die Transkriptionsregulation über STAT-Moleküle vermitteln. Weiterhin ist eine Aktivierung der MAPK über endosomale Rezeptor-Arrestin-Komplexe bekannt (Mellado *et al.*, 2001; Pierce *et al.*, 2001).

#### **1.3.4. Die Regulation der GPCR-Aktivität**

Die Aktivität von GPCRs wird hauptsächlich durch drei Schritte, die Desensitivierung, die Internalisierung sowie die Resensitivierung oder den lysosomalen Abbau reguliert (Abb.1.5). Als Desensitivierung wird der Verlust der Aktivierbarkeit eines Rezeptors nach wiederholter Stimulation mit einem Liganden bezeichnet. Die Desensitivierung wird durch die Phosphorylierung des Rezeptors durch die Mitglieder der G-Protein-gekoppelte Rezeptor-





**Abb. 1.5. Molekulare Mechanismen der GPCR-Internalisierung und des GPCR-Recyclings.** Die Bindung des Liganden führt zur Dissoziation der G-Protein  $\alpha$ -Untereinheit von der  $\beta\gamma$ -Untereinheit und führt so zur Aktivierung von Signalwegen (1.) GRKs interagieren mit  $\beta\gamma$ -Untereinheiten und induzieren so die Phosphorylierung des GPCRs. Die Phosphorylierung erleichtert die Bindung von Adaptermolekülen, die eine erneute Aktivierung von G-Proteinen durch den Rezeptor sterisch verhindern (2.) und eine Dynamin-abhängige Endozytose vermitteln (3). Im endosomalen Kompartiment erfolgt anschließend ein Transport zurück an die Plasmamembran (4), oder ein lysosomaler Abbau. (Modifiziert nach Mokros, 2004)

kinasen (GRKs) oder *Second-messenger*-abhängige Kinasen (PKA, PKC) eingeleitet. Dadurch wird eine Kopplung des Rezeptors an sein G-Protein vermindert. Zusätzlich erhöht die Phosphorylierung des Rezeptors durch GRKs seine Affinität für Adaptermoleküle, wie  $\beta$ -Arrestin. Durch die Bindung von  $\beta$ -Arrestin-Molekülen an den phosphorylierten Rezeptor wird sterisch eine erneute Bindung mit einem G-Protein verhindert.

Nach Aktivierung durch ihre Liganden werden fast alle GPCRs internalisiert. Ursprünglich wurde vorgeschlagen, daß dieser Mechanismus vorwiegend dazu benötigt wird, den „gebrauchten“, desensitvierten Rezeptor von der Zelloberfläche zu entfernen. Aus heutiger Sicht sind jedoch weitere Funktionen hiermit verknüpft worden. Dabei wird durch die Internalisierung das Entstehen intrazellulärer Signalkomplexe an Rezeptor-tragenden Endosomen, der Abbau des Rezeptors und damit eine lang anhaltende Desensitivierung sowie die Bereitstellung des Rezeptors für das Recycling zurück zur Zelloberfläche für eine kontinuierliche Signalleitung reguliert (siehe Übersichten in Luttrell und Lefkowitz, 2002; Tsao *et al.*, 2001; Ferguson, 2001). Der am besten verstandene Mechanismus der GPCR-Internalisierung ist die

Endozytose eines Rezeptors über Clathrin-umhüllte Vesikel (*clathrin coated vesicle*, CCV). Bei vielen GPCRs ist dieser Vorgang abhängig von Arrestin-Molekülen. Diese besitzen neben Bereichen, die mit dem Rezeptor interagieren, auch Bereiche, die an Clathrin und den Clathrin-assoziierten Adapterkomplex AP-2 binden (Goodman *et al.*, 1996; Laporte *et al.*, 1999). Untersuchungen am  $\beta$ -adrenergen Rezeptors ergaben, daß der aktivierte Rezeptor zunächst  $\beta$ -Arrestin-Moleküle bindet und daraufhin zusammen mit Arrestin zu bereits existierenden Clathrin-angereicherten Membranbereichen oder CCV transportiert wird (Santini *et al.*, 2002). Die GTP-ase Dynamin vermittelt im Folgenden eine Abschnürung der Vesikel von der Plasmamembran. Nach der Internalisierung der CCV dissoziieren die  $\beta$ -Arrestin-Rezeptorkomplexe, die Rezeptoren werden dephosphoryliert und an die Zelloberfläche transportiert, wo sie einer erneuten Stimulation zur Verfügung stehen. Alternativ kann der lysosomale Abbau der Rezeptoren erfolgen.

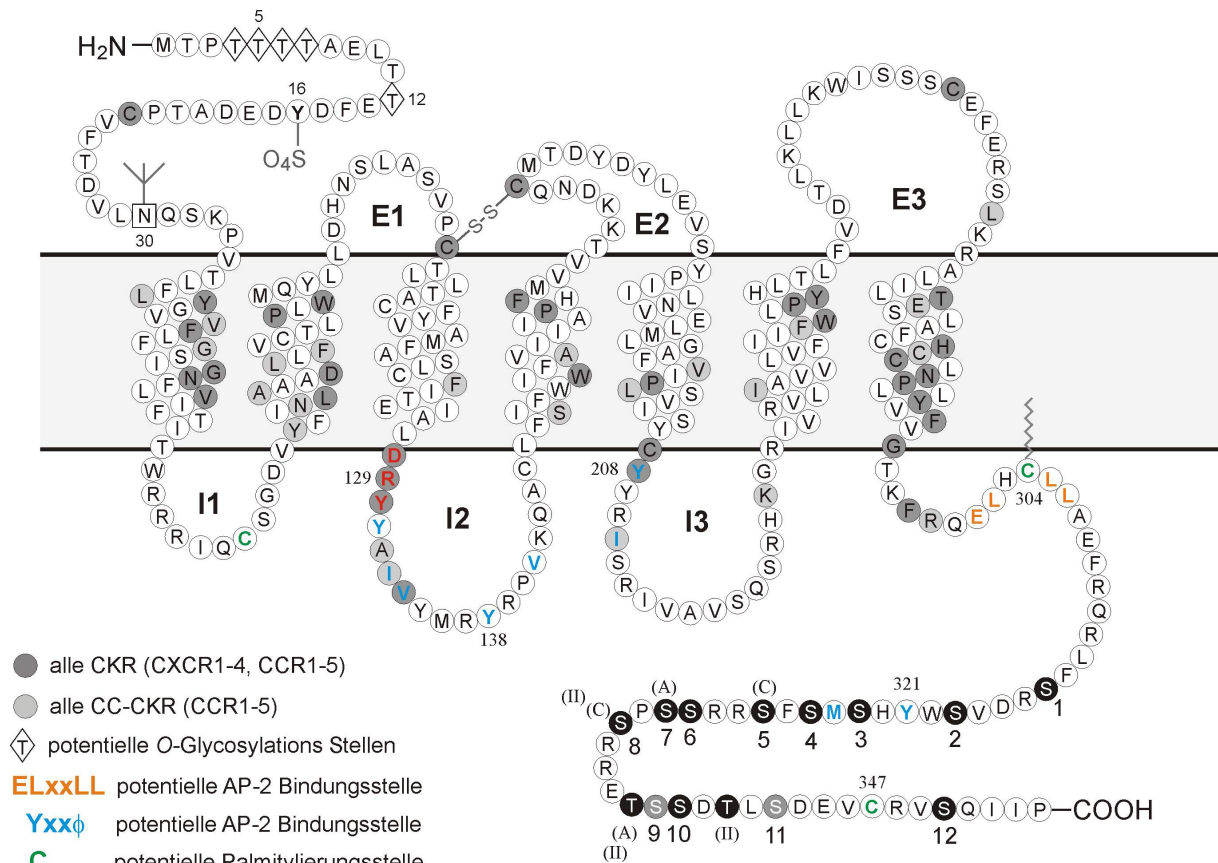
Abhängig von der Interaktion der GPCRs mit  $\beta$ -Arrestin-Molekülen können GPCRs in zwei Gruppen unterteilt werden (Oakley *et al.*, 2001; Oakley *et al.*, 2000; Tohgo *et al.*, 2003). Zur ersten Gruppe gehören der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor, der  $\mu$ -Opioidrezeptor und der Endothelin-A-Rezeptor. Sie binden  $\beta$ -Arrestin-2 mit höherer Affinität als  $\beta$ -Arrestin-1 und zeichnen sich durch eine nur vorübergehende Interaktion mit  $\beta$ -Arrestin-Molekülen aus, da der Rezeptor- $\beta$ -Arrestin-Komplex bereits während oder kurz nach der Internalisierung zerfällt. Diese Rezeptoren erreichen die Endosomen ohne  $\beta$ -Arrestin und werden schnell wieder an die Oberfläche transportiert. Im Gegensatz dazu binden der Angiotensin-1a-Rezeptor, der Neurokininrezeptor oder der Vasopressinrezeptor-2  $\beta$ -Arrestin-1 und -2 mit gleicher Affinität und bilden stabile Komplexe, die zusammen die Endosomen erreichen. Dort können sie bis zu 4 h verbleiben. Diese Rezeptoren recyceln nur langsam an die Oberfläche. Untersuchungen am  $\beta$ -adrenergen Rezeptor und am Vasopressinrezeptor zeigten, daß die unterschiedlichen Affinitäten der Rezeptoren zu den  $\beta$ -Arrestin-Molekülen sowie die Unterschiede im Recycling durch den C-Terminus der verschiedenen GPCRs bestimmt werden (Oakley *et al.*, 2000).

Neben der Rezeptorphosphorylierung sind weitere Sequenzmotive bekannt, die eine Clathrin-abhängige Endozytose vermitteln. Durch Dileuzin- und Tyrosin-basierende Sequenzmotive, wie FxNPxY oder Yxx $\phi$  (x steht für jede beliebige Aminosäure und  $\phi$  für hydrophobe Aminosäuren), kann die direkte Bindung des Rezeptors an die  $\mu_2$ -Untereinheit des heterotetrameren AP-2-Komplexes vermittelt werden. Der AP-2-Komplex vermittelt dann über seine  $\alpha$ - und  $\beta_2$ -Untereinheit gleichzeitig eine Bindung an Clathrin-Moleküle (Ferguson, 2001; Kirchhausen *et al.*, 1997). Neben einer Clathrin-abhängigen Internalisierung ist für GPCRs auch die

Internalisierung durch Caveolae beschrieben. Caveolae sind flaschenförmige Membraneinbuchtungen, die reich an Cholesterin und Phospholipiden sind und darüber hinaus Caveolin als Struktur-vermittelndes Markerprotein enthalten. Dynamin reguliert wie auch im Clathrin-vermittelten Weg die Abschnürung der Caveolae. Über eine mögliche Bedeutung der Caveolae für die Regulation der GPCR-Aktivität ist bisher wenig bekannt.

### 1.4. Der viral-kodierte Chemokinrezeptor US28

Das HCMV kodiert für vier Gene, US27, US28, UL33 und UL78, die eine Sequenzhomologie mit humanen Chemokinrezeptoren aufweisen (Abb. 1.6). Dennoch konnte US28 bislang als einziger funktioneller Rezeptor für die Chemokine RANTES, MIP-1 $\alpha$  und - $\beta$ , MCP-1 und -3 sowie Fraktalkine identifiziert werden (Billstrom *et al.*, 1998; Bodaghi *et al.*, 1998; Kledal *et al.*, 1998; Neote *et al.*, 1993). Nach Bindung des Chemokins RANTES bewirkt der US28-Rezeptor eine durch  $G\alpha_i$ - und  $G\alpha_{16}$ -Untereinheiten vermittelte Aktivierung von ERK 2 (Billstrom *et al.*, 1998; Gao und Murphy, 1994). Neben dieser Liganden-vermittelten Aktivierung von Signalwegen weist der US28-Rezeptor auch eine Liganden-unabhängige, konstitutive Aktivität auf. Dabei konnte eine konstitutive, durch  $G\alpha_q$ -Untereinheiten-vermittelte Aktivierung von PLC, CREB (*cyclic AMP response element binding protein*) und NF- $\kappa$ B beobachtet werden (Casarosa *et al.*, 2001; Waldhoer *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurde die Liganden-unabhängige Endozytose und das konstitutive Recycling des US28-Rezeptors beschrieben (Fraile-Ramos *et al.*, 2001). *In vitro*-Untersuchungen an einem US28-deletierten HCMV-Stamm zeigten, daß US28 nicht essentiell für die Replikation des Virus war (Vieira *et al.*, 1998). Daher werden gegenwärtig drei mögliche *in vivo* Funktionen des US28-Rezeptors diskutiert: Zum einen scheint die Aktivierung proliferativer Signalwege, wie NF- $\kappa$ B, CREB und der MAPK, möglicherweise für eine Etablierung der Viruslatenz oder für den Schutz vor Apoptose notwendig zu sein (Billstrom Schroeder *et al.*, 2002; Casarosa *et al.*, 2001; Waldhoer *et al.*, 2002). Des weiteren könnte der US28-Rezeptor an einer Ausbreitung des HCMV im Organismus beteiligt sein, da durch die hochaffine Bindung des US28-Rezeptors an das membranständige Chemokin Fraktalkine die Zellfusion begünstigt wird. Dadurch könnte eine Infektion Fraktalkine-exprimierender Zellen erleichtert werden (Haskell *et al.*, 2000; Kledal *et al.*, 1998). Weiterhin vermittelt der US28-Rezeptor nach Stimulation mit den Chemokinen



**Abb. 1.6. Der HCMV kodierte Chemokinrezeptor US28.** Konservierte homologe Aminosäuren für die CXC-Chemokinrezeptoren wurden dunkelgrau und für die CC-Chemokinrezeptoren hellgrau unterlegt. Mögliche C-terminale Phosphorylierungsstellen sind durch weiße Schrift auf dunklem Grund gekennzeichnet und von eins bis zwölf nummeriert. Potentielle Palmitylierungsstellen des C-Terminus befindet sich an der Position 304 und 347. Die Vorhersagen zur Membrantopologie und Proteinstruktur erfolgte mit dem „HUSAR-Paket 6.0“. **E1-E3:** extrazelluläre Domäne 1-3; **I1-I3:** intrazelluläre Schleifen 1-3; **A:** potentielle PKA-Phosphorylierungsstellen **C:** PKC-Phosphorylierungsstellen; **II:** potentielle Caseinkinase II-Phosphorylierungsstellen (Modifiziert nach Mokros, 2004).

RANTES oder MIP-1 $\alpha$  die Migration infizierter arterieller glatter Muskelzellen (SMCs), wodurch die Ausbreitung des HCMV im Organismus begünstigt würde. Es wurde vorgeschlagen, daß die Migration der SMCs eine mögliche Ursache für HCMV-bedingte Arteriosklerosen und Restenosen von Herzkranzgefäßen darstellt (Streblov *et al.*, 1999). Schließlich wird durch US28 möglicherweise die Rekrutierung von Leukozyten an den Ort der Infektion verhindert, da US28 das Entfernen der inflammatorischen Chemokine RANTES und MIP-1 $\alpha$  aus der Umgebung HCMV infizierter Zellen bewirkt (Bodaghi *et al.*, 1998; Randolph-Habecker *et al.*, 2002). Somit könnte diese Eigenschaft des US28-Rezeptors als Teil des HCMV-Repertoires angesehen werden, der menschlichen Immunantwort zu entgehen.

## 1.5. Fragestellung

US11 und US28 lassen sich der Gruppe der HCMV-kodierten Gene zuordnen, die an der Beeinflussung des menschlichen Immunsystems beteiligt sind.

Die Expression von US11 bewirkt eine verminderte Präsentation von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Oberfläche HCMV-infizierter Zellen. In einem heterologen Expressionssystem sollte untersucht werden:

- ob die Expression des US11-Proteins in DCs ausreichend ist, eine DC-abhängige Aktivierung zytotoxischer T-Zellen zu verhindern.

Es wird angenommen, daß die Umgehung der menschlichen Immunantwort durch den US28-Rezeptor sowohl durch die Aktivierung verschiedener Signalwege, als auch durch die Depletion inflammatorischer Chemokine am Infektionsort erfolgt. Basierend auf Mutagenesestudien sollte in Kombination mit verschiedenen zellbiologischen und biochemischen Methoden untersucht werden:

- welche strukturellen Eigenschaften für die konstitutive und Liganden-vermittelte Signalleitung des US28-Rezeptors verantwortlich sind.
- über welche Endozytosewege die US28-vermittelte Chemokinentfernung erfolgt und welche Adaptermoleküle daran beteiligt sind.
- welche strukturellen Bereiche des US28-Rezeptors an der Regulation der Endozytose involviert sind.

## 2. Material

### 2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

**Amersham Pharmacia Biotech** (Freiburg): *Enhanced Chemilumineszens* (ECL) Reagenzien, Protein A-Sepharose®, *Rainbow*-Proteinmarker, PD-10 Säulen,

**Eastman Kodak Company** (Stuttgart): Röntgenfilme (X-OMAT AR), Filmentwickler und –fixierer

**Genomed** (Bad Oeynhausen): JetStar Plasmidisolationssäulen und –puffer (*Plasmid Purification Maxi Kit*)

**E. Merck AG** (Darmstadt): Ammoniumpersulfat (APS), Ampizillin, Kanamycin

**Qiagen** (Hilden): Qiaquick *Gel Extraction Kit*

**PAA** (Cölbe): RPMI, DMEM, Penizillin, Streptomycin, Trypsin EDTA

**R&D Systems GmbH** (Wiesbaden): rekombinantes murines GM-CSF, humanes RANTES

**Roche Diagnostics** (Mannheim): Fugene 6

**C. Roth GmbH** (Karlsruhe): Agar-Agar, Albumin Fraktion V (BSA),

Ammoniumhydrogencarbonat, Cäsiumchlorid, Dimethylsulfoxid (DMSO), Essigsäure, Ethanol, Ethidiumbromid, Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA), Glaswolle, Glycerin, Glycin, Hefe-Extrakt, N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES), Isoamylalkohol, Isopropanol, Kaliumazetat,  $\beta$ -Mercaptoethanol, 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES), Methanol, 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS), Natriumazid, Natriumchlorid, Natriumdodecylsulfat (SDS), Natriumhydroxid, Natriumzitat, Rothiphorese® Gel 30 (30% AcrylamidstammLösung), Pepton aus Casein, Phenol, Salzsäure, Tween®-20, TEMED, Zitronensäure Monohydrat

**Sigma-Aldrich** (Taufenkirchen): Aprotinin, 4',6-Diamidino-2-Phenylindol

Dihydrochloridhydrat (DAPI), Digitonin, FilipinIII, Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin, Natriumfluorid (NaF), Natriumorthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), Paraformaldehyd, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Propidiumjodid (PI)

**Stratagene** (Amsterdam Niederlande): *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit*

## Radiochemikalien

[<sup>125</sup>I]RANTES human, rekombinant 2200 Ci/mmol (NEN Life Science Products, Köln)

[<sup>35</sup>S] Methionin/Cystein; EXPRE<sup>35</sup>S<sup>35</sup>S *Protein Labeling Mix* 1000 Ci/mmol (NEN, Köln)

[<sup>3</sup>H] Palmitat (NEN, Köln)

## 2.2. Bakterien

### *E.coli* DH5α

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten sowie die Amplifikation von Plasmid-DNA.

Genotyp: F<sup>-</sup>, *endA1*, *hsdR17*, (*r*<sub>K</sub><sup>-</sup>, *m*<sub>K</sub><sup>+</sup>), *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, Δ(*argF-lacZ*) U169, Φ80*lacZ*Δ*M15*, λ-

## 2.3. Plasmide

- **pcDNA3.1©(-)** (Invitrogen Corporation, Karlsruhe)
- **pRL-TK** (Promega, Mannheim)
- **US28 wt** Plasmid in pcDNA 3.1(-), **US28 STA** und **US28 C347A** (Thilo Mokros, AG Dr. Martin Lipp unter der Leitung von Dr. Uta E. Höpken MDC, Berlin)
- **FLAG-CCR5** Plasmid in pEF-BOS (Dr. Martin Oppermann, Institut für Immunologie, Universität Göttingen) (Oppermann *et al.*, 1999).
- **6NF-κBTkluc.neo** (AG Dr. Claus Scheidereit MDC, Berlin)
- **CXCR5** in pcDNA (AG Dr. Martin Lipp MDC, Berlin)
- **pCMV5-βarr1**, **p(S65T)GFP-N3-βarrestin1**, **pCMV5-βarr2**, **p(S65T)GFP-N3-βarrestin2**, **pcDNA1-V53D**, **pCBI-dynamin**, **pCBI-K44A**, **pcDNA3.1-β2-adaptin FLAG**, **pcDNA3.1-β2-adaptin 664-937** (Dr. Marc Caron Howard Hughes Medical Institut, Duke Universität, Durham USA) (Laporte *et al.*, 2002)
- **pCMV-PI3Kp110γ (PI3Kγ) wt** und die dominant negative Mutante **pCMV-PI3Kp110γ delta 942-981** (Dr. C.S. Abrams Universität von Pennsylvania, Philadelphia USA) (Ma *et al.*, 1998)

## 2.4. Oligonukleotide

Die Oligodesoxynukleotid-Primer für die Polymerase-Kettenreaktion wurden von der Firma BioTeZ GmbH, Berlin Buch bezogen.

**XbaCCR5-s:** 5'-GCT CTAGAG CATGGATTATCAAGTGTCAAGTCCA-3' (*Xba*)

**CCR5Hind-as:** 5'-CCCAAGCTTGGGTCAACAAGCCACAGATATTCC-3' (*Hind III*)

**Arrestin s:** 5'-CAA TAAGCT TACCATGGT TTCCTACAAGTGAAAGTG-3' (*Hind III*)

**Arrestin as:** 5'-AGATGGATCCCTATCTGTCGTTGAGCCG-3' (*BamH I*)

**US28sXba:** 5'-GCTCTAGAGCCATGACACCGACGACGACG-3' (*Xba*)

**US28asHind:** 5'-CCCAAGCTTGGGGTATGAAAAGGCCGAGGTAGCGGC-3' (*Hind III*)

**US28d1-2s:** 5'-GTGGTACCAGGCTACATCGCGGGCAAAGAGTCGC-3' (*Kpn I*)

**US28d3-5s:** 5'-GGTGGTACCACGCCATGGCCTTTGCGCGTCGG-3' (*Kpn I*)

**US28d3-8s:** 5'-GGTGGTACCACGCCATGGCCTTTGCGCGTCGGGCCGCGCCGGC  
TCGAAGAGAG-3' (*Kpn I*)

**US28d6-8s:** 5'-GGTGGTACCACAGCATGAGCTTTTCGCGTCGGGCCGCGCCGGC  
TCGAAGAGAG-3' (*Kpn I*)

**US28d9-12as:** 5'-CCCAAGCTTTTATTACGGTATAATTTGTGCGACGCGACACAC  
CTCGTCGGCCAGCGTGTGCGCAGCTGTCTCTCT-3' (*Hind III*)

**US28 DRYs:** 5'-CACGGAGATTGCACTCGATGCCTACTACGCTATTGTTTAC-3'

**US28 DRYas:** 5'-GTAAACAATAGCGTAGTAGGCATCGAGTGCAATCTCCGTG-3'

**US28 Dillfw:** 5'-GAACTACACTGTGCG GCG GCCGAGTTTCGC-3'

**US28 Dillrev:** 5'-GCGAAACTCGGCCGCCGCACAGTGTAGTTC-3'

**US28 seclpfw:** 5'-CTCGATCGCGCCGCCCGCTATTGTTTACATGAGAGCTCGGCCT-3'

**US28seclprev:** 5'-TACAGGCCGAGCTCTCATGTAAACAATAGCGGCGGCGCGATCGAG-3'

**US28 thirdloopfw:** 5'-CAGCTACTGCGCCTACCGCATTTCC-3'

**US28 thirdloopprev:** 5'-GGAAATGCGGTAGGCGCAGTAGCTG-3'

**US28ctermfw:** 5'-GATGTATCCTGGGCCCACAGCATGAGC-3'

**US28ctermrev:** 5'-GCTCATGCTGTGGGCCAGGATACATC-3'

## 2.5. Enzyme

**Invitek GmbH** (Berlin): CombiPol DNA Polymerase Mix

**NEB GmbH** (Frankfurt a. M.): Alkalische Phosphatase (CIP), Restriktionsendonukleasen

**Roche Diagnostics** (Mannheim): T4 DNA-Ligase



## 2.6. Antikörper und Streptavidinkonjugate

**Labor Dr. A. Rehm** (MDC, RRK): anti-human MHC-Klasse-I-Antikörper HC10 und anti-human MHC-Klasse-I-Antikörper W6/32HL (Barnstable *et al.*, 1978; Stam *et al.*, 1990).

**Thilo Mokros** (AG Lipp unter der Leitung von Dr. Uta E. Höpken MDC, Berlin) stellte im Rahmen seiner Dissertation die monoklonalen Maus-anti-US28-Antikörper Tub-6 und Tub-45 her (Mokros *et al.*, 2002).

**AG Lipp** (MDC): Ratte-anti-CXCR5-Antikörper (Hybridom 8B2)

**Dr. Martin Oppermann** (Institut für Immunologie, Universität Göttingen) stellte den Maus-anti-CCR5-Antikörper R22/7 zur Verfügung (Pollok-Kopp *et al.*, 2003).

**Cell Signaling** (NEB GmbH, Frankfurt/ a.M.): Kaninchen-anti-Phospho- p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) -Antikörper, Kaninchen-anti- p44/42 MAPK-Antikörper, Peroxidase-gekoppelter anti-Kaninchen-Antikörper

**Jackson Immunoresearch Laboratories** (Dianova Hamburg): Ratte-anti-Maus-IgG Cy3 gekoppelt, Ziege-anti-Maus-IgG Biotin gekoppelt, Esel-anti-Kaninchen-IgG Cy3 gekoppelt, Ziege-anti-Maus-IgG und -IgM FITC gekoppelt

**Molecular Probes** (Leiden, Niederlande): Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 und Alexa Fluor<sup>®</sup> 568, jeweils Streptavidin-gekoppelt

**Pharmingen** (BD Heidelberg): Biotin-markierter anti-Maus-CD8-Antikörper, anti-Maus-CD11c Biotin markiert, anti-Maus-H-2L<sup>d</sup>/D<sup>b</sup> Biotin markiert, anti-Maus-H-2K<sup>b</sup> Biotin markiert, anti-Maus-H-2D<sup>b</sup> Biotin markiert, anti-Maus-CD86 FITC gekoppelt, anti-Maus-I-A<sup>b</sup> FITC markiert, anti-Maus-CD8 APC gekoppelt

**R&D Systems GmbH** (Wiesbaden): Maus-anti-CCR5-Antikörper Klon 45523.111

**Santa Cruz Biotechnology** (Heidelberg ): polyklonales Kaninchen-anti-Caveolin-1-Antiserum, affinitätsaufgereinigt

**Sigma-Aldrich** (Taufenkirchen): Anti-FLAG<sup>®</sup> monoklonaler Antikörper M2

**Southern Biotechnology** (Eching): Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Maus-Antikörper

## 2.7. Geräte und sonstige Materialien

**Amersham Pharmacia Biotech** (Freiburg): Geltrackner (Hofer SE 1160 *DryGel* Sr.)

**Beckman Instruments GmbH** (Heidelberg): Beckman L7t55 Ultrazentrifuge

**Becton-Dickinson GmbH** (Heidelberg): Durchflußzytometer (FACSscan™)

**Berthold GmbH** (Bad Wildbach): Gammazähler (Wallac 1470 WIZARD®), Luminometer (Luminat LB 9507)

**Eppendorf** (Hamburg): Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2,0 ml, Thermomixer comfort

**Greiner GmbH** (Nürtingen): Mikrobiologische Zellkulturschalen Ø 10 cm, sterile 15 ml Röhrchen

**Heraeus** (Hanau): Brutschränke, Tischzentrifugen Biofuge pico und fresco

**Leica** (Bensheim): Fluoreszenzmikroskop Leica DM IRBE

**Nerbe plus GmbH** (Winsen/Luhe): sterile, RNase-/DNase-freie Filter-Pipettenspitzen

**Nunc GmbH** (Wiesbaden): Einfriereröhrchen *Cryotube* 2 ml

**PALL** (VWR International GmbH, Darmstadt): Acrodisc® sterile Spritzenfilter, 25 mm, 0,45 µm Porengröße

**TPP**: Zellkulturschalen und -flaschen, sterile 15 ml und 50 ml Zentrifugenröhrchen

**Carl Zeiss Mikroskopie** (Göttingen): AxioCam™ color Digitalkamera für die Mikroskopie, Zeiss LSM für die Konfokale Mikroskopie

## 2.8. Zellen

**HEK293A** Subklon von HEK293-Zellen, der fest an der Plastikzellkulturschale haftet (HEK293: Ad5 transformierte, humane, embryonale Nierenzelllinie; epithelial) (Quantum Biotech. Inc. ATCC CRL-1573)

**MCA205** Methylcholantren induzierte Fibrosarkom Zelllinie, wurde freundlicherweise von der Gruppe von Prof. Dr. Thomas Blankenstein (MDC) zur Verfügung gestellt

## 2.9. Adenoviren

Adenoviren, die für US11 und LacZ kodieren waren in der Arbeitsgruppe von Dr. A. Rehm vorhanden.

## 2.10. Medien

### Medien für die Bakterienkultur

#### ⇒ **LB-Medium**

5 g Hefe-Extrakt, 10 g Bacto-Trypton, 5 g NaCl ad 1 l ddH<sub>2</sub>O, autoklaviert

#### ⇒ **LB-Medium zur Vektorselektion**

100 mg Ampizillin / l LB-Medium

30 mg Kanamycin / l LB-Medium

Feste Nährböden wurden durch Zugabe von 15 g Agar-Agar auf 1 l Medium hergestellt. Der Agar löste sich durch das Autoklavieren (20 min bei 120°C, 2 bar).

### Medien für die Säugetier-Zellkultur

#### ⇒ **Bindungsmedium (BM)**, für Internalisierungsexperimente

RPMI 1640 ohne Bicarbonat; 0,2% BSA; 10 mM HEPES pH 7,4; Sterilfiltration

#### ⇒ **Saures Medium**, Waschmedium bei Internalisierungsexperimenten

RPMI 1640 ohne Bicarbonat; 0,2% BSA; 10 mM MES; pH 2,5 (HCl); Sterilfiltration

## 2.11. Puffer

### Proteinelektrophorese und Westernblot

#### ⇒ **Isolation Detergenz-resistenter Membranen**

25 mM Pipes, pH 6,5; 150 mM NaCl, 1% TX-100, 1 mM PMSF

#### ⇒ **Laufpuffer**

50 mM Tris, 0,38 mM Glycin, 0,1% SDS

#### ⇒ **Lysepuffer** für die Zellextraktion mit Detergenz

PBS pH 7,3; 1% TX-100, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF (frisch vor Gebrauch zusetzen)

#### ⇒ **NET-Puffer**

50 mM Tris, pH 7,4, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,5% NP-40

⇒ **PBS/T- Puffer** für das Waschen von Immunoblots

PBS; 0,1% Tween-20

⇒ **Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

**Sammelgelpuffer** 0,5 M Tris pH 6,8; 0,4% SDS

**Trenngelpuffer** 1,5 M Tris pH 8,8; 0,4% SDS

Gellösungen SDS-PAGE	Trenngel 12,5 %	Sammelgel
ddH <sub>2</sub> O	16,75 ml	7,5 ml
Puffer	12,5 ml	3,13 ml
Acrylamidlösung (Rotiphorese® Gel 30, 30 % Acrylamid; 0,8 % Bisacrylamid)	20,75 ml	1,8 ml
10 % APS (ddH <sub>2</sub> O)	250 µl	90 µl
TEMED	25 µl	9 µl

⇒ **2x Protein-Probenpuffer** für die SDS-PAGE

125 mM Tris/HCl pH 6,8; 4% SDS; 0,2% Bromphenolblau; 20% Glycerin; 5% β-Mercaptoethanol

⇒ **TBS/T-Puffer** für das Waschen von Immunoblots

20 mM Tris pH 7,6; 140 mM NaCl; 0,1% Tween-20

⇒ **Transferpuffer**, Westernblot

25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol

### **DNA-Gelelektrophorese und Plasmidpräparation**

⇒ **P1, P2, P3** für den alkalischen Schnellaufschluß von Bakterien:

**P1 (Zellsuspension):** 50 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM EDTA, 100 mg/l RNase A

**P2 (Zellyse):** 200 mM NaOH, 1% SDS

**P3 (Neutralisation):** 3,1 M Kaliumazetat, ad Essigsäure pH 5,5

⇒ **10x DNA-Probenpuffer**

30% Ficoll 400, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylene-Cyanol FF, 30% Glycerol

⇒ **TAE-Puffer (50x)**, für die Agarosegelelektrophorese

242 g Tris, 57,1 ml Eisessig, 37,2 g  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ad 1l  $\text{ddH}_2\text{O}$

⇒ **Transformationspuffer (TfP)** zur Herstellung chemokompetenter Bakterien

**TfPI:** 75 ml  $\text{ddH}_2\text{O}$ ; 0,75 g KCl; 1 g  $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0,3 g Kaliumazetat; 0,15 g  $\text{CaCl}_2$ ; 15 ml Glycerin auf pH 5,5 mit 0,2 M Eisessig einstellen,  $\text{ddH}_2\text{O}$  auf 100 ml, steril filtrieren

**TfPII:** 75 ml  $\text{ddH}_2\text{O}$ ; 0,21 g MOPS; 0,08 g KCl; 1,1 g  $\text{CaCl}_2$ ; 15 ml Glycerin; pH 6,8 mit 0,5 M NaOH einstellen;  $\text{ddH}_2\text{O}$  auf 100 ml, sterilfiltrieren

### Zellkultur und zytologische Färbungen

⇒ **2x HBS Puffer**, für die Kalziumphosphat-Transfektion

50 mM HEPES pH 7,1; 280 mM NaCl; 1,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

⇒ **10x Lysepuffer**, für Erythrozyten

89,9 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 g  $\text{KHCO}_3$ , 0,37 g EDTA pH 7,3

⇒ **Mowiollösung**, für die Mikroskopie

24 ml einer 0,2 M Tris/HCl pH 8,5- Lösung, 12 g Glycerin, 4,8 g Mowiol 4-88, 30-40 min bei 50°C rühren, abzentrifugieren, Lagerung bei 4°C

⇒ **PBS**

0,14 M NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,3

## **2.12. Mäuse**

- C57BL/6 wt Tiere
- LCMV P-14 transgene C57BL/6 Rag<sup>-/-</sup> Mäuse, die transgen für einen T-Zellrezeptor sind, der das LCMV-P14-Peptid gp33-41 auf MHC-Klasse-I-H2-D<sup>b</sup>-Molekülen erkennt, wurden freundlicherweise von der Gruppe Prof. Dr. Thomas Blankenstein (MDC, Berlin) zur Verfügung gestellt (Gladow *et al.*, 2004).

## **2.13. Peptid**

Peptid zur Beladung der dendritischen Zellen gp33 des LCMV P14-Proteins (gp33-41)-KAVYNFATC (Biosynthan, Berlin)

## 3. Methoden

### 3.1. Nukleinsäure-Techniken

#### 3.1.1. DNA-Amplifikation mit Hilfe der PCR

Die *in vitro*-Amplifikation von DNA erfolgte durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Sie wurde (nach Mullis und Faloona, 1987) mit Hilfe thermostabiler DNA-Polymerasen in 25-35 Zyklen durchgeführt. Ein Zyklus bestand aus der Hitzedenaturierung der Matrizen-DNA (95 °C, 45 s), der Primeranlagerung (55-65°C, 45 s) und der Kettenverlängerung (72°C, 90 s). Die hergestellten DNA-Stränge wurden nach ihrer Fertigstellung in einen Expressionsvektor kloniert. Da sie anschließend in eukaryotischen Zellen zur Proteinexpression verwendet wurden, wurde ein Polymerasemix mit „*proofreading*“ Aktivität verwendet. Alle hergestellten PCR-Produkte wurden nach ihrer Klonierung durch die Firma Invitek (Berlin) sequenziert.

Der Standard-PCR-Ansatz bestand aus folgenden Komponenten:

Reagenz	Konzentration im 50µl Ansatz
DNA-Matrize	1µl
Optiperform Puffer III (10x)	5µl
OptiZyme ( <i>Enhancer</i> )	10µl
MgCl <sub>2</sub> [50 mM]	2µl
dNTPs	je 0,2 mM
3' - und 5' -Primer	je 25 pM
CombiPol-Polymerase	1 U

#### 3.1.2. Agarosegelelektrophorese

Vektor-DNA oder PCR-Produkte wurden in 0,8-1 %-igen Agarosegelen (= 0,8-1g Agarose in 100 ml 1 x TAE-Puffer; 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) aufgetrennt und analysiert. Hierzu wurden die PCR-Produkte oder die Vektor-DNA mit 1/10 Volumen eines 10 x DNA-Probenpuffer gemischt und in die Taschen des Gels geladen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele auf dem UV-Tisch ausgewertet und gegebenenfalls wurden Banden zur weiteren Verwendung ausgeschnitten.

### **3.1.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mittels Zentrifugation. Dazu wurden am Boden eines 0,5 ml Reaktionsgefäßes mit einer Kanüle ein Loch gestochen und dieses mit einem Glaswollpfropf verschlossen. Die ausgeschnittenen DNA-Banden wurden in das Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß gestellt und 10 min bei 13.000 Upm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die im Durchlauf befindliche DNA wurde dann anschließend mit Hilfe von Ethanol gefällt.

Bei nur geringen Ausgangsmengen wurde der „*Qiaquick Gel Extraction Kit*“ von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

### **3.1.4. Reinigungsmethoden für Nukleinsäuren**

#### **3.1.4.1. Phenol/Chloroform-Extraktion**

Nukleinsäuren wurden von Proteinen durch eine Extraktion mit Tris-gepuffertem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1, v/v/v) getrennt. Zu der Probe, die aus einem Mindestvolumen von 0,1 ml bestand, wurde das gleiche Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol gegeben. Das Gemisch wurde 30 s mit dem Vortexer gemischt und danach 5 min in der Tischzentrifuge bei 13.000 Upm zentrifugiert. Die wäßrige obere Phase wurde abgenommen und die in ihr enthaltenden Nukleinsäuren durch Alkoholpräzipitation konzentriert.

#### **3.1.4.2. Präzipitation von Nukleinsäuren mit Alkohol**

Für die DNA-Fällung wurde die Nukleinsäure enthaltende Probe zunächst auf eine Endkonzentration von 0,25 M Natriumazetat eingestellt. Nach Zugabe des 2,5-fachen Volumens einer 96 %-igen Ethanol-Lösung wurde die Probe bei –20°C für mindestens 30 min gefällt. Die Nukleinsäuren wurden anschließend durch Zentrifugation (4°C, 30 min, maximale Geschwindigkeit, Tischzentrifuge) pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet und in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **3.1.5. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen**

Für die Spaltung von DNA mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet. Für 1 µg DNA wurden 1 bis 2 U der entsprechenden Endonukleasen verwendet und diese mit der DNA für 1 bis 4 h bei 37 °C inkubiert. Das Volumen des zugesetzten Enzyms/der Enzyme betrug jedoch nicht mehr als 1/10 des Gesamtvolumens. Ein Aliquot des Restriktionsansatzes wurde auf ein Agarosegel geladen, um zu prüfen, ob eine vollständige DNA-Spaltung erfolgt war. Bei DNA, die darauffolgend zur Klonierung verwendet werden sollte, wurden die Enzyme nach Herstellerangaben durch Hitze inaktiviert. Bei Enzymen, die sich nicht durch Hitze inaktivieren ließen, wurde eine Phenolextraktion mit anschließender Fällung der DNA durch Ethanolpräzipitation durchgeführt.

### **3.1.6. Abspaltung von 5'-Phosphatresten durch alkalische Phosphatase**

Zur Verhinderung intramolekularer Religation wurden vor der Ligation die 5'-Phosphatgruppen des Vektors enzymatisch entfernt. Dazu wurden die DNA-Fragmente nach der Restriktionsspaltung und der Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen durch die Zugabe von einer Einheit alkalischer Phosphatase 30 min bei 37 °C dephosphoryliert. Der Reaktionsansatz wurde zur Inaktivierung der alkalischen Phosphatase für 10 min bei 70° C erhitzt. Die enthaltenden DNA-Fragmente wurden anschließend über ein Agarosegel aufgereinigt.

### **3.1.7. Ligation von DNA-Fragmenten**

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde unter Verwendung von einer Einheit T4-Ligase pro Mikrogramm eingesetzter DNA in einem 10 µl Reaktionsansatz durchgeführt. Ein Standardligationsansatz enthielt 300 ng des zu klonierenden Fragmentes, 100 ng des linearisierten Vektors, 1 µl 10 x Ligationspuffer, T4-Ligase und ddH<sub>2</sub>O. Die Ligation erfolgte über Nacht (16 h) bei 16°C in einem Wasserbad.



### **3.1.8. Herstellung transformationskompetenter Bakterien**

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten wurden Bakterien des DH5 $\alpha$ -Stammes verwendet. 5 ml LB-Medium wurden mit den Bakterien in einer Übernachtskultur angeimpft. Nach 16 h wurden 3 ml der Bakteriensuspension in 500 ml LB-Medium überführt und bis zum Erreichen der OD<sub>600</sub> von 0,6 weiterkultiviert. Die Kultur wurde 30 min auf Eis gekühlt und anschließend 10 min bei 3000 xg bei 4°C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 100 ml eiskaltem Transformationspuffer I resuspendiert und im Anschluß 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und in 20 ml Transformationspuffer II aufgenommen. Je 200  $\mu$ l der Bakteriensuspension wurden in Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **3.1.9. Transformation**

Das halbe Volumen des Ligationsansatzes wurde mit 70  $\mu$ l kompetenten Bakterien vermischt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 s erfolgte eine erneute Inkubation für 2 min auf Eis. Danach wurde der Bakteriensuspension 1 ml LB-Medium zugegeben und 60 min in einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden pelletiert, in 100  $\mu$ l LB-Medium aufgenommen und anschließend auf LB-Agarplatten, die zur Selektion Ampizillin enthielten, ausgestrichen und 16 h bei 37°C inkubiert.

### **3.1.10. Isolierung von Plasmiden aus Bakterien**

Geringe Mengen Plasmid-DNA wurden mit Hilfe des alkalischen Bakterienaufschlusses präpariert. Dazu wurde ein Bakterienklon in 3 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach 16 h wurden 1,5 ml der Zellsuspension 1 min bei 13.000 Upm pelletiert und in 250  $\mu$ l Puffer 1 resuspendiert. Anschließend wurden 250  $\mu$ l des Puffers 2 zugegeben, vorsichtig gemischt, und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Zugabe von 250  $\mu$ l Puffer 3 und vorsichtigem Mischen folgte eine Inkubation von 10 min auf Eis. Bakterielle Proteine, Zellreste und genomische DNA wurden anschließend durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 13.000 Upm in der Tischzentrifuge entfernt und der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde durch Ethanolpräzipitation gefällt und das entstandene DNA-Pellet in 50  $\mu$ l Wasser aufgenommen.

### 3.1.11. Präparative Plasmidisolierung

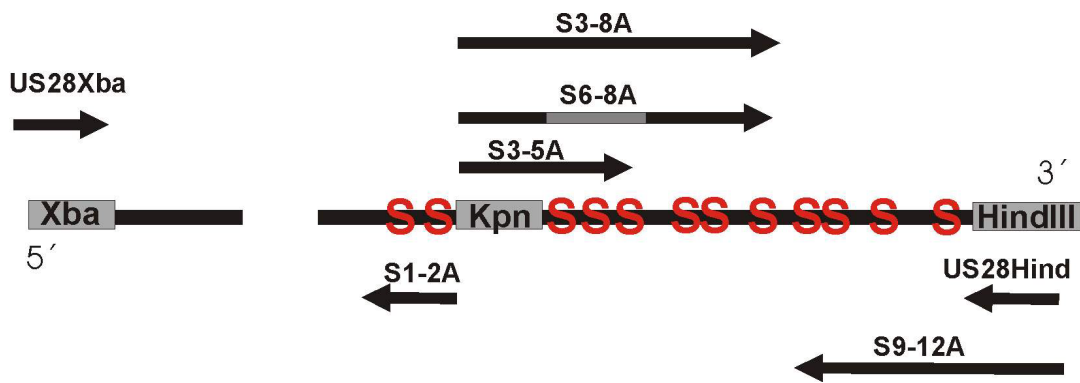
Für die Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurden 400 ml LB-Medium mit einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Bakterien bei 3.500 xg pelletiert. Die Plasmidisolierung erfolgte nach dem Prinzip des alkalischen Bakterienaufschlusses mit anschließender Anionenaustauscher-Säulenchromatographie. Für die Präparation wurden Anionenaustauscher-Säulen und Puffer der Firma Genomed nach Herstellerangaben verwendet.

## 3.2. Einführung von Mutationen in cDNA mittels PCR

In die Nukleotidsequenz des US28-Rezeptors wurden Punktmutationen mittels PCR eingeführt. Die hierbei verwendeten PCR-Primer enthielten von der US28 Sequenz abweichende Basenfolgen, die für die gewünschte Änderung der Aminosäuresequenz kodierten. Dabei wurden verschiedene Strategien verwendet.

### 3.2.1. Mutagenese der C-terminalen Serinreste

Für den Austausch der potentiellen Phosphorylierungsstellen am C-Terminus des US28 Rezeptors konnte eine natürlich vorkommende *Kpn* I-Schnittstelle benutzt werden. Der Austausch der 12 Serinreste erfolgte in verschiedenen Gruppen gegen Alaninresten. Um die ersten beiden Serinreste an Position 315 und 319 auszutauschen, wurden die Primer US28d1-2 und US28s*Xba* verwendet (siehe Abbildung 3.1.). Als Matrize wurde dabei das US28 wt Plasmid verwendet. Das daraus resultierende PCR-Produkt wurde durch die Restriktionsendonukleasen *Xba* I und *Kpn* I geschnitten und in ein ebenfalls mit *Xba* I und *Kpn* I geschnittenes Plasmid eingeführt, das die US28 wt Sequenz enthielt. Der Austausch der Serinreste 3-5 (323, 325, 327), 6-8 (330, 331, 333) und 3-8 (323-333) gegen Alaninresten erfolgte durch die PCR mit Hilfe der entsprechenden Primer US28d3-5s, US28d6-8s und US28d3-8s und dem 3' N-terminalen Primer US28as*Hind*, der eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *Hind* III kodiert. Die PCR-Produkte wurden durch *Kpn* I und *Hind* III geschnitten und in ein *Kpn* I und *Hind* III geschnittenes Plasmid eingeführt, das die US28 wt-Sequenz enthielt. Die Mutagenese der Serinreste 9-12 (338, 339, 343 und 350) erfolgte durch PCR mit Hilfe der Primer



**Abb. 3.1** Mutagenese potentieller Phosphorylierungsstellen im C-Terminus des US28-Rezeptors (Erläuterungen siehe Text 3.2.1)

US28sXba und US28d9-12as. Das entstandene PCR-Produkt wurde *Xba* I, *Hind* III geschnitten und in pcDNA3.1(-) eingefügt. Zum Austausch der Serinreste 3-12 (323-350) wurden die Primer US28d9-12as und US28sXba verwendet. Als Matrize wurde hierbei das US28 S3-8A Plasmid verwendet, bei dem die Serinreste der Positionen 323-333 bereits durch Alaninreste ersetzt waren. Der komplette Austausch der Serinreste 1-12 entstand durch *Kpn* I und *Hind* III-Spaltung der Plasmide US28 S1-2A und US28 S3-12A und anschließender Ligation des US28 S3-12A-Fragmentes in den US28 S1-2A-Vektor.

### 3.2.2. Mutagenese der auf Tyrosinresten und Doppel-Leuzinresten basierenden AP-2 Adapterstellen sowie des Cysteinrestes C347 des US28 Rezeptors

Für den Austausch der Tyrosinreste (Y130-138, Y208, Y321), Leuzinreste (LL305/306) oder des Cysteinrestes (C347) konnten keine natürlich vorkommenden Restriktionsschnittstellen verwendet werden. Deshalb wurden jeweils zwei DNA-Fragmente der DNA-Matrize getrennt amplifiziert, die die Bereiche N- und C-terminal der zu mutierenden Nukleotide abdeckten und sich in diesem Bereich überlappten. Durch die Einführung der Mutation in den 3'-Primer (für die Amplifikation des N-terminalen Abschnittes) und in den 5'-Primer (für die Amplifikation des C-terminalen Abschnittes), die einander komplementär sind, wurde diese Mutation in der amplifizierten DNA verwirklicht. Die beiden PCR-Produkte wurden mit jeweils 20 Zyklen amplifiziert, über ein Agarosegel aufgereinigt und gemeinsam, unter Verwendung des 5'aminoterminalen Primers (US28sXba) und des 3'carboxyterminalen Primers (US28asHind) erneut 20 Zyklen amplifiziert. Das entstandene PCR-Produkt wurde durch die Restriktionsendonukleasen *Xba* I und *Hind* III geschnitten und in pcDNA3.1(-) kloniert.

### 3.2.3. Herstellung der US28 R129A-Mutante

Der Austausch des Argininrestes 129 zu einem Alaninrest wurde mit Hilfe der Quick change „site-directed mutagenese“ Reagenzien von Stratagene durchgeführt. Dazu wurden einander komplementäre Primer, die für die Mutationen kodierten, entworfen. Die parentale Plasmid-DNA wurde zunächst durch Erhitzen auf 95°C denaturiert. Es folgte die Anlagerung der Mutageneseprimer an die DNA-Stränge durch Abkühlung auf 55°C und die Elongation der Primer durch die Turbo-Pfu-Polymerase bei 68°C. Durch häufige Wiederholung der Reaktionsschritte wurde ein Plasmid amplifiziert, das die gewünschte Mutation enthielt. Nach Abkühlung des Ansatzes auf 37°C schloß sich eine Behandlung mit der Endonuklease *Dpn* I an, die spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA schneidet. Da Plasmid DNA, die in *E.coli* DH5 $\alpha$  amplifiziert wurde, methyliert ist, erfolgte auf diese Weise der Verdau parentaler DNA, während die *in vitro* amplifizierte, mutierte DNA erhalten blieb.

## 3.3. Zellkultur

### 3.3.1. Kultivierung von Säugetierzelllinien

HEK293A-Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und einer Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit 5 %-igem CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Als Standard-Zellkulturmedium wurde DMEM verwendet, dem 10 % FKS (vor Zugabe durch Hitzebehandlung bei 56 °C inaktiviert), 100 U/ml Penizillin, 100µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin zugesetzt wurden. Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, in Zellkulturmedium resuspendiert und im Verhältnis 1:5 bis 1:10 auf neue Zellkulturgefäße verteilt.

### 3.3.2. Transfektion von HEK293A-Zellen mit der Kalziumphosphat-Methode

Die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion so ausgesät, daß sie zum Zeitpunkt der Transfektion 50-70 % konfluent gewachsen waren. Die Puffer und Lösungen wurden auf Raumtemperatur erwärmt. Für die Transfektion der Zellen einer Kulturschale von 10 cm Durchmesser wurden 10 µg Plasmid-DNA mit 50 µl der 2,5 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung gemischt und auf ein Gesamtvolumen von 500 µl mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Diese Mischung wurde tropfenweise zu 500 µl 2 x HBS-Lösung unter Schütteln auf dem Vortexer zugegeben. Das Präzipitat wurde nach 20 min Minuten tropfenweise unter Schwenken der Kulturschale auf den Zellen

verteilt. Nach einer Inkubation von 16-24 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in frischem Zellkulturmedium weiterkultiviert.

### **3.3.3. Transfektion von HEK293A-Zellen mit Fugene 6**

HEK293A-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion auf Schalen ausgesät, so daß sie zum Zeitpunkt der Transfektion 70 % konfluent waren. Für eine Zellkulturschale von 10 cm Durchmesser wurden 3 µg DNA verwendet. Da die Transfektionseffizienz verschiedener Zelllinien durch das Verhältnis von Fugene 6 zur DNA-Menge bestimmt wird, wurde zunächst in Testtransfektionen mit GFP das Fugene/DNA Verhältnis ermittelt. HEK293A-Zellen wurden durch ein Verhältnis von 3:1 (Fugen [µl]/DNA-Menge[µg]) optimal transfiziert.

Für die Transfektion wurde 3 µg DNA in einem Reaktionsgefäß vorgelegt. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 9 µl Fugene in 300 µl Optimem Medium verdünnt. Danach wurde die Optimem-Fugene-Mischung zur DNA gegeben, gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Transfektionsansätze auf die Zellen.

### **3.3.4. Amplifikation und Aufreinigung von Adenoviren**

HEK293A-Zellen wurden in 15 cm Platten ausgesät. Wenn die Zellen eine Konfluenz von 70-80 % erreicht hatten, wurden sie mit den zu amplifizierenden Adenoviren infiziert. Nach 24-48 h zeigten alle Zellen einen zytopathischen Effekt. Sie wurden vorsichtig geerntet und pelletiert. Das Zellpellet wurde in 7 ml Medium aufgenommen und dreimal eingefroren und wieder aufgetaut, um die Zellmembranen zu zerstören und die Viruspartikel freizusetzen. Nach dem letzten Auftauen wurde das Zellysate 20 min bei 300 x g zentrifugiert und der trübe Überstand auf einen Cäsiumchloridgradienten geladen. Der Cäsiumchloridgradient wurde durch Überschichten von 10 ml 1,4 M CsCl-Lösung mit 8 ml einer 1,2 M CsCl-Lösung hergestellt. Die Gradienten wurden 3 h in einer Ultrazentrifuge bei 100.000 xg zentrifugiert. Nach der Zentrifugation waren die Viruspartikel als ein weißer Ring sichtbar. Sie wurden mit einer 5 ml Spritze abgesaugt und ein zweites Mal in kleinerem Volumen über einen CsCl-Gradienten aufgereinigt. Dazu wurden 4 ml der 1,4 M CsCl mit 3 ml 1,2 M CsCl und 3 ml der Virussuspension überschichtet. Der Gradient wurde 16 h bei 100.000 xg in der Ultrazentrifuge zentrifugiert und die Viruspartikel am nächsten Tag in einem kleinen Volumen abgesaugt. Um das

CsCl aus der Viruspräparation zu entfernen, erfolgte ein Pufferaustausch über eine Gelfiltrationssäule PD10 (Pharmacia). Dazu wurde die Säule mit 50 ml PBS äquilibriert. Das Virus wurde auf die Säule geladen und Eluate in einem Volumen von 5-7 Tropfen aufgefangen. Fraktionen, die Virus enthielten, konnten durch eine leicht milchige Trübung identifiziert werden. Diese trüben Fraktionen wurden vereinigt und nach Zugabe von 10 % (v/v) Glycerol bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.3.5. Bestimmung des Adenovirustiters

Der Virustiter wurde als Doppelbestimmung durch die  $\text{TCID}_{50}$ -Methode (*Tissue Culture Infectious Dose<sub>50</sub>*) ermittelt. Zur Bestimmung des Virustiters wurde Standard-Kulturmedium (siehe 3.3.1) mit 2 % FKS verwendet. Es wurden zwei 96-Loch-Platten mit  $1 \times 10^4$  HEK293A Zellen/Loch in 100  $\mu\text{l}$  Medium ausgesät. 10 Löcher pro Platte wurden mit jeweils 100  $\mu\text{l}$  einer Verdünnungsstufe ( $10^{-6}$  bis  $10^{-13}$ ) des aufgereinigten Virus infiziert. 16 weitere Löcher pro Platte dienten als Kontrolle und wurden mit je 100  $\mu\text{l}$  Medium/Loch inkubiert. Nach 10 Tagen wurde das Verhältnis der Löcher der Zellen, die einen vollständigen zytopathischen Effekt zeigten, zur Gesamtzahl der infizierten Löcher pro Verdünnungsstufe bestimmt. Zeigten zum Beispiel die HEK293A-Zellen bei der Verdünnung der Virussuspension von  $10^{-8}$  in 8 von 10 Löchern einen vollständigen zytopathischen Effekt. Darum würde dieser Verdünnungsstufe ein Wert von 0,8 zugeordnet werden. Das Verhältnis aller Verdünnungsstufen ( $10^{-1}$  bis  $10^{-13}$ ) wurde addiert und als s-Wert in folgende Formel einbezogen:

$$T = 10^{1+1(s-0,5)}$$

Da die  $\text{TCID}_{50}$  um ca. 0,7 Logstufen größer ist, als die Anzahl der Viren pro ml bei einem Plaque Assay, wurde 0,7 von T subtrahiert, um einen mit dem Plaqueassay vergleichbaren Wert zu erhalten.

### 3.3.6. Infektion von Säugetierzellen mit Adenovirus

Für die Infektion von Säugetierzellen wurden verschiedene Mengen infektiöser Viruspartikel pro Zelle, MOIs, eingesetzt. Dabei wurden für eine MOI von 100 entsprechend 100 infektiöse Viruspartikel pro Zelle verwendet. Für die Infektion von  $1 \times 10^6$  Zellen wurden 100  $\mu\text{l}$  eines aufgereinigten Virus mit einem Titer von  $10^8/100 \mu\text{l}$  benutzt. Die Infektion der Zellen erfolgte in serumfreien Medium für 4 h.

### **3.4. Durchflußzytometrie**

#### **3.4.1. Nachweis von Oberflächenmolekülen**

Eine quantitative Untersuchung von Molekülen auf der Zelloberfläche, aber auch intrazellulärer Antigene, erfolgte mit Hilfe der Durchflußzytometrie. Adhärent wachsende Zellen wurden mit PBS gewaschen und unter vorsichtigem Pipettieren geerntet. Stark adhärent wachsende Zellen wurden mit Hilfe von PBS/2 mM EDTA von der Platte gelöst. Die Zellen wurden zentrifugiert und in kaltem PBS gewaschen. Für die Untersuchung von Oberflächenmolekülen wurden die Zellen in 50 µl FACS-Puffer (PBS, 0,5 % BSA, 0,01 % NaN<sub>3</sub>) aufgenommen und mit den entsprechenden Antikörpern oder einem gleichen Volumen eines Hybridomüberstandes für 30 bis 60 min bei 4°C inkubiert. Dem zweimaligem Waschen mit kaltem FACS-Puffer folgte eine Inkubation mit einem Fluorochrom-gekoppelten anti-Immunglobulin-Antikörper, sofern der im ersten Inkubationsschritt verwendete Antikörper nicht selbst mit einem Farbstoff markiert war. Für Biotin-markierte Antikörper wurde im zweiten Schritt ein Farbstoff-markiertes Streptavidinkonjugat eingesetzt. Der zweite Inkubationsschritt erfolgte für 30 min bei 4°C, die Zellen wurden danach zweimal gewaschen und durchflußzytometrisch untersucht. Auf Zellen, die große Mengen Fc-Rezeptoren exprimierten (z.B. DCs), erfolgte vor der Immunfärbung ein zusätzlicher Blockierungsschritt mit Serum der Spezies des zweiten Antikörpers. Für die sichere Unterscheidung, ob ein Protein an der Oberfläche exprimiert ist, wurde direkt vor der Messung zusätzlich mit 4 µM Propidiumjodid (PI) gefärbt. Dieser Farbstoff dringt durch geschädigte Zellmembranen in das Innere der Zelle ein und färbt die DNA im Zellkern an. PI positive Zellen wurden von der Auswertung der Zelloberflächenexpression ausgeschlossen.

#### **3.4.2. Nachweis intrazellulärer Epitope**

Die Untersuchung intrazellulärer Antigene erfolgte an fixierten und permeabilisierten Zellen. Dazu wurden 1-5 x 10<sup>6</sup> Zellen in 5 %-iger Paraformaldehydlösung (5 % PFA in PBS) 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen und in Digitoninlösung (0,0025 % Digitonin in PBS) 7-8 min bei RT permeabilisiert. Die Zellen wurden gewaschen, in FACS-Puffer resuspendiert und die Färbung mit den Antikörpern erfolgte wie im vorherigen Abschnitt beschrieben.

### 3.5. T-Zellproliferationsassay

#### 3.5.1. Ausreifung und Aufreinigung dendritischer Zellen aus Knochenmarkszellen

Die Präparation dendritischer Zellen (DCs) erfolgte nach dem Protokoll von T. Schüler {Schüler, 2002 #1227}. Dazu wurden Knochenmarkszellen aus Femur und Tibia von C57BL/6 Mäusen entnommen. Die Zellen wurden auf 6-Loch-Platten ausgesät und nach einer Stunde wurden nicht adhärente Zellen in einer Konzentration von  $4 \times 10^6/\text{ml}$  in 6-Loch-Platten überführt. Die Kultivierung der Knochenmarkszellen erfolgte in RPMI mit 10 % FKS und 20 ng/ml murinem GM-CSF. Um die Aktivierung der dendritischen Zellen zu verhindern, wurden die Zellen über 12 Tage in den gleichen Platten ausgereift. Am ersten und dritten Tag nach der Präparation wurden nicht adhärente Zellen entfernt. Ab Tag 5 wurde an jedem zweiten Tag 50 % des Mediums entfernt und durch frisches GM-CSF-haltiges Medium ersetzt. Am Tag 12 nach der Präparation wurden die dendritischen Zellen geerntet und der Reifungsgrad und die Reinheit der Kultur durch die Expression von CD11c und CD86 durchflußzytometrisch überprüft. Um eine möglichst reine DC Population zu verwenden, wurden noch verbliebene B- und T-Zellen aus der Kultur durch paramagnetische Kügelchen, die mit anti-CD19- oder anti-CD3-Antikörpern gekoppelt waren, nach Herstellerangaben entfernt.

#### 3.5.2. Präparation der Mausmilzzellen

Die für den T-Zellproliferationsassay benötigten T-Zellen wurden aus Milzzellen von LCMV P14-transgenen C57BL/6 Rag -/- Mäusen gewonnen. Die Milzen wurden mit dem Kolben einer 5 ml Spritze zerrieben, um die Zellen zu vereinzeln und anschließend in 10 ml RPMI aufgenommen und in ein 14 ml-Röhrchen überführt. Größere Organtrümmer setzten sich nach kurzer Zeit am Boden eines 14 ml Röhrchens ab und konnten durch Überführen der Zellsuspension in ein neues Gefäß entfernt werden. Erythrozyten wurden durch eine 5-minütige Inkubation in Erythrozyten-Lysepuffer entfernt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen. Im Anschluß erfolgte eine Plattenadhärenz der Milzzellen für eine Stunde. Die nicht adhärenzten Zellen, die die T-Zellen enthielten, wurden geerntet und mit 5  $\mu\text{M}$  CFSE bei 37°C 10 min inkubiert. Die CFSE gefärbten Zellen wurden dreimal gewaschen und ihre erfolgreiche Farbstoffaufnahme wurde durchflußzytometrisch überprüft.



### **3.5.3. Durchflußzytometrische Untersuchung der CD8 T-Zellproliferation**

Da der Einfluß von US11 auf die Präsentation von Peptiden an MHC-Klasse-I-Molekülen an CD8 T-Zellen untersucht werden sollte, wurden die DCs mit US11 oder LacZ kodierenden Adenoviren infiziert oder blieben uninfiziert. Die Hälfte der DCs wurde mit 5 µg/ml des LCMV-Peptids über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden je  $1 \times 10^5$  Milzzellen mit jeweils  $1 \times 10^4$ ,  $2,5 \times 10^4$  oder  $5 \times 10^4$  DCs/Loch in einer 96-Loch-Platte inkubiert. Nach drei Tagen wurde die Proliferation der CD8 T-Zellen durch die Verminderung der grünen Fluoreszenz durchflußzytometrisch bestimmt. Dazu wurde die Kokultur mit PBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen durch eine 20-minütige Inkubation in Blockierungspuffer (PBS 10 % FKS, 1 % Mausserum und 2 mM EDTA) abgesättigt. Die Zellen wurden gewaschen und die T-Zellen wurden eine Stunde mit einem APC-konjugierten CD8 $\alpha$ -Antikörper gefärbt. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen mit dem Durchflußzytometer FACScan (Becton-Dickinson) analysiert. Die Auswertung der Meßdaten erfolgte mit dem Programm „WinList 3.0“. In die Auswertung der Proliferation wurden nur CD8 $\alpha$  positive T-Zellen einbezogen.

### **3.6. Immunzytochemie und Immunfluoreszenzmikroskopie**

HEK293A-Zellen wurden auf Kollagen beschichtete Deckgläschen ausgesät und am folgenden Tag transfiziert. 36-48 h nach der Transfektion wurden die immunzytochemischen Färbungen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und danach 20 min mit PBS/5 % Paraformaldehydlösung bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,1 % TX-100/PBS für 15 min bei RT permeabilisiert. Alternativ erfolgte die Permeabilisierung mit Saponin. Dazu enthielten alle während der Antikörperfärbung verwendeten Puffer 0,5 % Saponin. Unspezifische Bindungen wurden mit PBS/0,5 % BSA, 3 % Ziegenserum für 30 min blockiert. Die anschließenden Färbeschritte wurden in PBS/0,5 % BSA durchgeführt. Zunächst erfolgte die Inkubation mit dem antigenspezifischen Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur. Nach drei bis fünfmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen entweder mit einem Biotin-markierten oder Fluorochrom-markierten anti-Immunglobulin-Antikörper inkubiert. Bei der Kolo-kalisation von US28 und AP-2 wurden die Zellen zunächst mit dem aus der Maus stammenden anti-Flag-Antikörper M2 inkubiert, gefolgt von einem Esel-anti-Maus-Cy3 konjugierten Antikörper, dann erst wurde der US28-Rezeptor mit dem Biotin-markierten Tub-6 gefärbt. Biotin-markierte Antikörper wurden in einem weiteren Schritt mit Streptavi-

din/Fluorochrom–Konjugate gefärbt. Nach viermaligem Waschen wurden die Deckgläschen mit Mowiolösung auf den noch feuchten Präparaten fixiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte unter Anleitung von Prof. Dr. Ricardo Hermosilla an einem Zeiss LSM Fluoreszenzmikroskop.

### **3.7. Metabolische Zellmarkierung mit Radioisotopen**

#### **3.7.1. Metabolische Zellmarkierung mit [<sup>35</sup>S] Methionin/Cystein**

5 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden in Methionin- und Cystein-freiem DMEM-Kulturmedium + 2,5 % FKS gewaschen und 30 min bei Kulturbedingungen inkubiert. Danach wurden die Zellen zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 2,5 ml des Methionin- und Cystein-freien DMEM-Kulturmedium, das mit 200 µCi [<sup>35</sup>S] L-Methionin/Cystein versetzt war, für 6 h inkubiert. Vor der weiteren Verwendung wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen.

#### **3.7.2. Metabolische Zellmarkierung mit [<sup>3</sup>H] Palmitat**

Vor der Verwendung mußte die Ethanol-haltige [<sup>3</sup>H] Palmitat-Lösung unter N<sub>2</sub> getrocknet werden. Das getrocknete [<sup>3</sup>H] Palmitat wurde in einer Konzentration von 1 mCi/25 µl in DMSO gelöst. HEK293A-Zellen wurden mit CCR5 und US28 transfiziert. 24 h danach wurden die Zellen in serumfreiem Medium für 16 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 4 h in serumfreiem DMEM, welchem 400 µCi/ml [<sup>3</sup>H] Palmitat und 0,1 % Fettsäure-freies BSA zugesetzt waren, metabolisch markiert.

### **3.8. Zellextraktion mit Detergenz**

Alle Schritte wurden mit eisgekühlten Reagenzien auf Eis durchgeführt.

Adhärente Zellen wurden mit PBS gewaschen und durch vorsichtiges Pipettieren von der Platte gelöst. Die Zellen wurden 3 min bei 2.800 Upm bei 4°C in der Tischzentrifuge pelletiert und in angemessener Menge (ca. 1-10<sup>7</sup> Zelle/ml) TX-100 haltigem Lysepuffer aufgenommen. Die Zellyse erfolgte für 30 min auf Eis. Zellkerne und unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei 13.000 Upm 10 min und 4 °C entfernt. Der Zentrifugationsüberstand (Zellsolubilisat) wurde sofort für Immunpräzipitationen eingesetzt oder in 2 x SDS-PAGE-Probenpuffer aufgenommen und auf ein SDS- Polyacrylamid-Gel geladen.

### 3.9. Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation von Proteinen aus Zellsolubilisaten wurden Protein A-Sepharose-Kügelchen mit den Protein-spezifischen Antikörpern beladen. Zellsolubilisate von radioaktiv markierten Zellen wurden zweimal mit Hitze inaktivierten *Staph. aureus* und 5 µl normalem Mausserum für 30 min bei 4 °C unter Rotation inkubiert, um unspezifisch bindende Moleküle zu entfernen. Bei Immunpräzipitationen, denen ein Immunblot folgte, entfiel dieser Schritt. Es folgte eine Inkubation der vorgereinigten Zellsolubilisate mit den antikörperbeladenen Protein A-Kügelchen für 2 h bei 4 °C unter Rotation. Anschließend wurden die Kügelchen vier- bis fünfmal in kaltem Lysepuffer gewaschen und in 100 µl 2 x SDS-PAGE-Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel geladen und aufgetrennt.

### 3.10. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde im Wesentlichen nach der von Laemmli 1970 beschriebenen Methode in einem diskontinuierlichen Puffersystem mit Trenngelen von 12,5 % Acrylamidgehalt durchgeführt. Bei dieser Methode werden Proteine durch die Kombination von oberem Sammelgel und unterem Trenngel an der Grenzschicht fokussiert, wodurch die Proteinbanden schärfer ausfallen als bei reinen Trenngelen. Die Fokussierung der Proben erfolgte in einem 3,5 %-igen Sammelgel. Die Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel in 2 x SDS-PAGE-Probenpuffer aufgenommen. Chemokinrezeptor enthaltende Proben wurden, wenn nicht anders angegeben, nicht auf 95 °C erhitzt. Alle anderen nachzuweisenden Proteine wurden 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt, bevor sie auf das Gel geladen wurden. Die Elektrophorese eines 13 x 16 cm Geles erfolgte bei konstanter Spannung 65 V für 14 h-16 h bei RT.

#### 3.10.1. Autoradiographie

SDS-Polyacrylamid-Gele wurden nach der Gelelektrophorese zur Entwässerung zweimal 30 min in DMSO inkubiert und anschließend 1h in einer gesättigten PPO/DMSO-Lösung geschwenkt. Danach wurden die Gele 20 min gewässert, bevor sie auf Filterpapier gelegt und 90 min bei 75 °C unter Vakuum getrocknet wurden. Radioaktiv markierte Proteinbanden wurden durch Exposition von Röntgenfilmen auf den getrockneten Gelen bei –80°C und anschließender photographischer Entwicklung sichtbar gemacht.

### **3.11. Immunblots**

#### **3.11.1. Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (Westernblot)**

Der Transfer von Proteinen aus dem Polyacrylamidgel auf Nitrozellulosemembranen wurde im Naßverfahren in einer Tank-Blot-Apparatur (Biorad) durchgeführt. Dazu wurde das Polyacrylamidgel direkt nach beendeter Gelelektrophorese einige Minuten in Transferpuffer inkubiert. Drei Filterpapiere und ein Membranstück entsprechend der Gelgröße wurden ausgeschnitten. Das Membranstück wurde ebenfalls einige Minuten in Transferpuffer inkubiert. Es wurde ein Stapel bestehend aus einem feuchten Schwamm, zwei feuchten Filterpapieren, dem Polyacrylamidgel, der Membran, einem weiteren feuchten Filterpapier und abschließend einem feuchten Schwamm gemäß Herstellerangaben in die Blotapparatur eingespannt. Es wurde darauf geachtet, daß die einzelnen Bestandteile des Stapels luftblasenfrei aufeinander lagen. Die Blotkammer wurde mit Transferpuffer gefüllt und der Transfer wurde bei 400 mA für 2 h durchgeführt.

#### **3.11.2. Immunfärbung von Proteinen**

Alle Inkubationsschritte wurden unter Schütteln für 1h bei RT durchgeführt. Davon abweichend erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers bei 4°C über Nacht. Nach dem Proteintransfer wurde die Nitrozellulosemembran in PBS/T, 5 % Milchpulver inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Hybridomüberstände 1:3-1:10 v/v) erfolgte in 5 % Milchpulver. Anschließend wurden die Membranen dreimal 5 min in PBS/T gewaschen und mit Peroxidase gekoppeltem Sekundärantikörper (1:5000 in 5 % Milchpulver) inkubiert. Vor Durchführung des Chemilumineszenz-Nachweises wurden die Membranen viermal mindestens 10 min in PBS/T gewaschen.

#### **3.11.3. Immundetektion von Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK) im Immunblot**

Im Gegensatz zu der zuvor beschriebenen Immunfärbung wurde die Immundetektion der MAPK mit Hilfe Phospho-(MAPK)-spezifischer Antikörper in TBST/T durchgeführt. Die Nitrozellulosemembran wurde nach dem Proteintransfer 1h in TBS/T 5 % Milchpulver (w/v) bei RT langsam geschüttelt. Die Membran wurde dreimal gewaschen und über Nacht mit dem

phosphospezifischen Antikörper (1:1000 in TBS/T; 5 % BSA) bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS/T gewaschen und anschließend mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (1:1000 in TBS/T; 5 % Milchpulver) für 1h bei RT unter Schütteln inkubiert. Vor Durchführung des Chemilumineszenz-Nachweises wurden die Membranen mindestens viermal für 10 min in TBS/T unter leichtem Schütteln gewaschen.

Zum Nachweis, daß gleiche Proteinmengen geladen wurden, wurden die gebundenen Nachweisantikörper nach der Durchführung des Chemilumineszenz-Nachweises zunächst von der Membran entfernt. Dazu wurden die Membranen nochmals mit TBS/T gewaschen und anschließend mit 0,1 M Glycin pH 2,7 für 30 min unter Schütteln bei RT inkubiert. Die Membran wurde mit ddH<sub>2</sub>O gespült und mit TBS/T; 5 % Milchpulver wurden unspezifische Bindungen abgesättigt. Es folgte eine Immunfärbung mit Antikörpern, die sowohl die phosphorylierten als auch nicht phosphorylierten Formen der MAPK erkennen.

### **3.11.4. Chemilumineszenz-Nachweis**

Die Chemilumineszenz-Methode diente zum Nachweis von Proteinbanden in Immunoblots, die mit Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern angefärbt wurden. Der Nachweis wurde mit Hilfe der „ECL“-Reagenzien (Amersham) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden 0,1 ml des 1:1 Gemisches (v/v) der Reagenzien 1 und 2 pro cm<sup>2</sup> Membran eingesetzt. Die Membran wurde 1 min mit dem Lösungsgemisch inkubiert, das Gemisch wurde abgetropft und die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien eingeschlagen. Anschließend wurde ein Röntgenfilm in einer Filmkassette 30 s bis 30 min auf der eingeschlagenen Membran exponiert und danach entwickelt.

### **3.12. Bestimmung der NF-κB-Aktivierung mit Hilfe des Luziferase-Assays**

Die Messung der NF-κB-abhängigen Transkription wurde mit Hilfe des Luziferase-Reporter-Plasmides „6NF-κBtkluc.neo“ (Bergmann 1998) durchgeführt. Das Plasmid enthält oberhalb des Luziferasegens sechs Wiederholungen der NF-κB-Bindungssequenz (GGGACTTCC) und eine minimale Thymidinkinasepromotorsequenz. Nach Aktivierung vermittelt NF-κB die Transkription des Luziferasegens. Als interne Kontrolle für Variationen in den Versuchsbedingungen, wie z.B. Zellzahl, Transfektionseffizienz, wurde eine weitere Luziferase unter

Kontrolle eines Thymidinkinasepromotors transfiziert (pRL-TK). Die Aktivität der beiden Luziferasen kann unabhängig voneinander bestimmt werden.

HEK293A-Zellen wurden in 6-Loch-Platten so ausgesät, daß sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 50 % erreichten. Es wurden verschiedene Plasmide mit der Kalziumphosphatmethode kotransfiziert :

6 NF- $\kappa$ Btkluc.neo	100 ng/Loch
pRL-TK	50 ng/Loch
pcDNA(-)/Rezeptor-cDNA	100 ng/Loch

Nach 24 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 6 h in serumfreiem Medium unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in PBS gewaschen und in 250  $\mu$ l „*Passive Lysis Buffer*“ (Promega) 30 min auf einem Schwenktisch lysiert und bis zur Messung der Luziferaseaktivität bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Jeweils 20  $\mu$ l des Lysates und je 50  $\mu$ l der Reagenzien I und II des Dualen Reporter Assay Kits wurden pro Messung im Luminometer verwendet. Reagenz I ermöglicht die Messung der Aktivität der Luziferase, die unter Kontrolle von NF- $\kappa$ B steht. Die Zugabe des Reagenz II unterdrückt diese Aktivität, erlaubt aber die Messung der Aktivität der zweiten, der Renilla-Luziferase. Die spezifische, NF- $\kappa$ B-abhängige Aktivität ergibt sich aus dem Quotienten aus der Aktivität der NF- $\kappa$ B-abhängigen Luziferase und der Renilla-Luziferase.

### 3.13. Internalisierung von [ $^{125}\text{I}$ ]-markiertem RANTES

HEK293A-Zellen wurden 24 h nach der Transfektion gewaschen und in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen pro Loch in einer 24-Loch-Zellkulturplatte ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen in kaltem Bindungsmedium gewaschen und nach der Zugabe von 250  $\mu$ l kaltem BM, das 125 pM [ $^{125}\text{I}$ ]-RANTES enthielt, für 2 h auf Eis inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt und nicht gebundener Ligand durch zweimaliges Waschen mit kaltem BM entfernt. Anschließend wurde warmes BM zu allen Zellen, mit Ausnahme der Zellen für den Zeitpunkt  $t=0$  min gegeben. Danach erfolgte die Internalisierung von Zelloberflächen-gebundenem [ $^{125}\text{I}$ ]-RANTES bei  $37^{\circ}\text{C}$  und normaler Atmosphärenumgebung. Nach 10 und 60 min wurden die Platten zur Beendigung des Internalisierungsvorgangs auf Eis gestellt und mit eiskaltem BM gewaschen, um nicht gebundenes [ $^{125}\text{I}$ ]-RANTES zu entfernen. Pro Zeitpunkt wurden vier Löcher verwendet. Zwei Löcher wurden erneut zweimal mit kaltem BM gewaschen und in 400  $\mu$ l 0,2 M NaOH lysiert. Von diesen Lysaten wurde die „Gesamte zellassoziierte Aktivität“ bestimmt. Die verbliebenen 2 Löcher wurden zweimal für 4 min mit gekühltem, saurem

Medium gewaschen, um Zelloberflächen-gebundenes [ $^{125}$ I]-RANTES zu entfernen. Die Zellen wurden ein weiteres mal mit BM gewaschen und in 400  $\mu$ l 0,2 M NaOH lysiert („Säure-resistente Aktivität“). Alle Zellysate wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt und in einem Gammazähler analysiert. Die Internalisierung wurde als der prozentuale Anteil der „Säure-resistenten Aktivität“ (internalisiert) an der „Gesamten zellassozierten Aktivität“ nach Abzug der Hintergrund-Aktivität zum Zeitpunkt  $t=0$  min berechnet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Rolle des HCMV-kodierten US11-Proteins auf die DC-vermittelte Aktivierung von T-Zellen

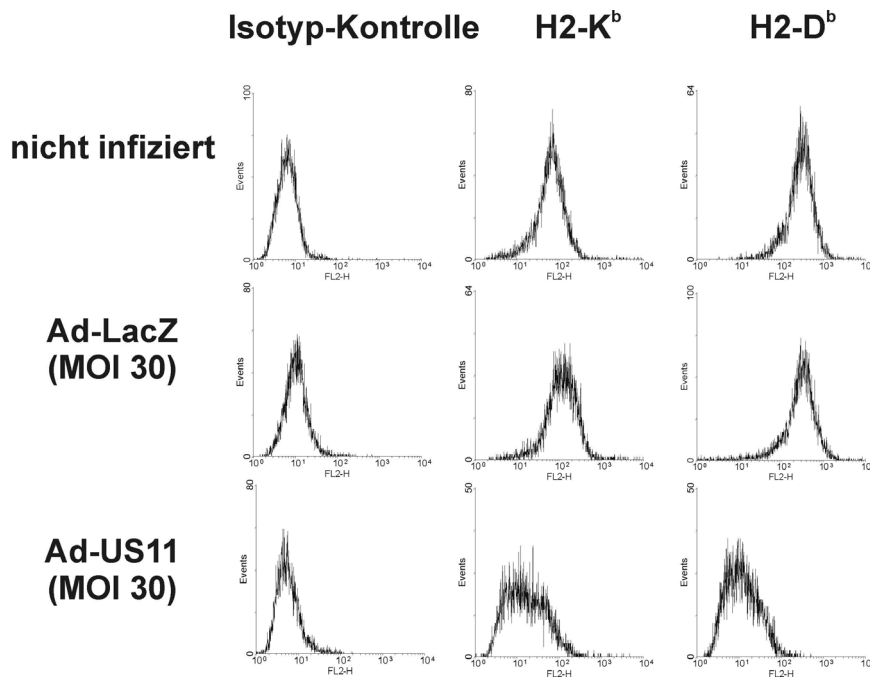
#### 4.1.1. US11 vermindert die Expression von Maus-MHC-Klasse-I-Molekülen

Virus-spezifische zytotoxische T-Zellen besitzen eine zentrale Bedeutung bei der Abwehr viraler Infektionen. Sie erkennen infizierte Zellen, da diese virale Peptide an der Zelloberfläche auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentieren. Das HCMV-kodierte Protein US11 ist im ER lokalisiert und bewirkt dort das Ausschleusen neu synthetisierter MHC-Klasse-Moleküle ins Zytoplasma, wo sie ubiquitiniert und durch das Proteasom abgebaut werden. Da bei den folgenden Untersuchungen das US11-Protein des humanen CMV verwendet wurde, sollte zunächst geprüft werden, ob US11 ebenfalls die Expression von Maus-MHC-Moleküle vermindert. Dazu wurden MCA-205-Zellen (H2-K<sup>b</sup>, H2-D<sup>b</sup>) mit rekombinanten Adenoviren infiziert, die jeweils für das US11-Protein oder die LacZ als Kontrollprotein kodierten. Nach 48 h wurde die Expression der MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche der infizierten Zellen durchflußzytometrisch bestimmt. Die Infektion mit dem Kontrolladenovirus führte zu einer leicht erhöhten Expression der H2-K<sup>b</sup>-MHC-Allele. Aber bereits bei einer MOI von 30 konnte eine Verminderung sowohl der H2-D<sup>b</sup> als auch der H2-K<sup>b</sup> MHC-Klasse-I-Moleküle nach Infektion mit dem für US11-kodierenden Adenovirus beobachtet werden (Abb. 4.1). Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß durch das humane Zytomegalivirus kodierte US11-Protein ebenfalls die Expression der Maus-MHC-Klasse-I-Moleküle vermindert wird.

#### 4.1.2. Die Expression des US11-Proteins in dendritischen Zellen vermindert die Expression von H2-D<sup>b</sup>-Molekülen

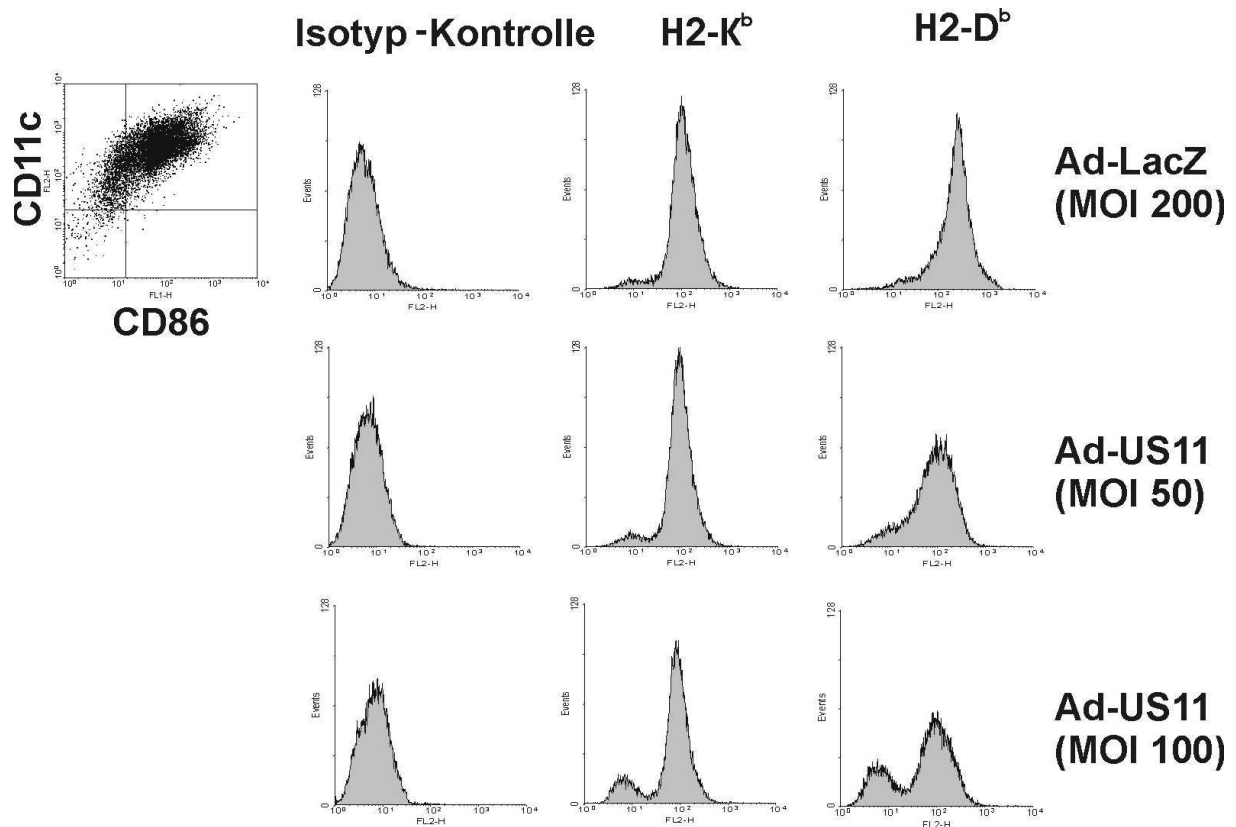
Die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen wird durch Antigen-präsentierende Zellen, wie Monozyten und Makrophagen oder DCs, vermittelt. Unreife DCs nehmen virale Antigene auf, die aus apoptotischen Zellen freigesetzt werden, und wandern über die afferenten Lymphbahnen zu einem drainierenden Lymphknoten. Dort präsentieren sie die viralen Antigene auf





**Abb. 4.1.** Die Expression des US11-Proteins bewirkt die Abnahme von Maus-MHC-Klasse-I-Moleküle H2-K<sup>b</sup> und H2-D<sup>b</sup> auf der Zelloberfläche von MCA-205-Zellen. MCA-205-Zellen wurden mit einer MOI von 30 mit Adenoviren infiziert, die für US11 oder  $\beta$ -Galaktosidase (LacZ) kodierten. Die Verminderung der MHC-Klasse-I-Moleküle H2-K<sup>b</sup> und H2-D<sup>b</sup> der MCA-205-Zellen durch US11 wurde 48 h nach der Adenovirusinfektion mittels MHC-spezifischer Antikörper durchflußzytometrisch bestimmt.

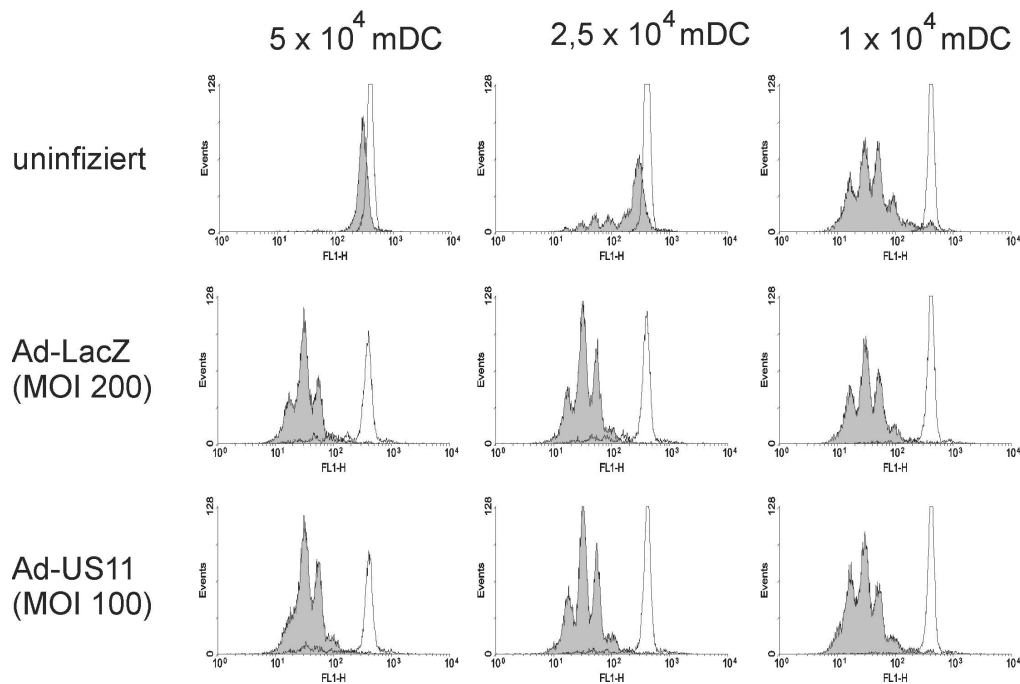
MHC-Molekülen und stimulieren die Aktivierung naiver zytotoxischer T- Zellen durch die Koexpression kostimulatorischer Moleküle wie CD80 und CD86. Um zu bestimmen, ob die verminderte Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle durch das US11-Protein eine Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen beeinflußt, wurde zunächst untersucht, ob US11 ebenfalls die Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle in dendritischen Zellen vermindert. Dazu wurden DCs mit den rekombinanten Adenoviren, die für US11 oder LacZ kodierten, infiziert. Die Expression ihrer MHC-Klasse-I-Moleküle wurde durchflußzytometrisch nach einer Immunfärbung bestimmt. Im Gegensatz zu der MCA-205-Zelllinie konnte bei den primären dendritischen Zellen nur eine geringere Verminderung der Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle nachgewiesen werden (Abb. 4.2). Dabei zeigte sich, daß die einzelnen MHC-Klasse-I-Allele unterschiedlich stark beeinflußt wurden. So war die Expression von H2-D<sup>b</sup> deutlich stärker vermindert als die der H2-K<sup>b</sup>-Moleküle.



**Abb. 4.2. US11 bewirkt eine verminderte Präsentation von MHC-Klasse-I-Molekülen nach Infektion dendritischer Zellen.** DCs wurden nach 12-tägiger Kultur mit GM-CSF aus Knochenmarksvorläuferzellen gewonnen und mit den angegebenen MOIs eines US11 oder LacZ kodierenden Adenovirus infiziert. Die Reinheit der DC-Kultur wurde durchflußzytometrisch durch die Doppelfärbung von CD11c (spezifische Anfärbung dendritischer Zellen in der Maus) und CD86 (kostimulatorisches Molekül, Zeigermolekül für die Ausreifung der DCs) nach der Infektion mit den Adenoviren bestimmt. Die Expression der MHC-Moleküle wurde durchflußzytometrisch analysiert.

#### 4.1.3. Die Proliferation von zytotoxischen T-Zellen wird nicht durch US11-Expression in DCs beeinflusst

In dem folgenden Ansatz sollte überprüft werden, in wie weit die Verminderung der MHC-Klasse-I-Moleküle durch das US11-Protein einen Einfluß auf die Aktivierung (Proliferation) von zytotoxischen T-Zellen hat. Da nach Infektion der DCs mit dem für US11 kodierenden Adenovirus H2-D<sup>b</sup>-Moleküle stärker beeinflusst waren, wurden dabei zytotoxische T-Zellen verwendet, die selektiv nur durch ein spezifisches Modellpeptid (gp33 des P14-Proteins des LCMV) auf H2-D<sup>b</sup>-Moleküle aktiviert werden. Für das Experiment wurden Maus-DCs mit einem für das US11-Protein-kodierenden Adenovirus oder einem Kontrolladenovirus (LacZ)



**Abb. 4.3. Die Reduktion der MHC-Klasse-I-Moleküle durch die Expression von US11 in dendritischen Zellen hat keinen Einfluß auf die LCMV P-14 induzierte T-Zellproliferation.** Dendritische Zellen wurden aus Knochenmarksvorläuferzellen in 12-tägiger Kultur ausgereift und mit rekombinanten Adenoviren, die für LacZ und U11 kodieren, infiziert oder sie blieben uniniziert. Die Hälfte der einzelnen DC-Ansätze wurden 4 h nach der Infektion mit dem gp33-Peptid des P14-Proteins des LCMV beladen. Am nächsten Tag wurden pro Ansatz die angegebene Anzahl dendritischer Zellen in 100 µl in eine 96-Lochplatte pipettiert und mit  $1 \times 10^5$  CFSE markierten Milzzellen für 3 Tage kokultiviert. Die grau unterlegten Graphen zeigen die Proliferation CD8-positiver zytotoxischer T-Zellen, die mit der angegebenen Anzahl DCs in Anwesenheit des spezifischen Peptids kultiviert wurden, während die T-Zellen der offenen Graphen ohne das spezifische Peptid mit der angegebenen Zahl der DCs kultiviert wurden.

infiziert oder sie blieben uniniziert. Die DCs wurden über Nacht mit dem Modellpeptid beladen und über 3 Tage mit Milzzellen der gp33-T-Zellrezeptor-transgenen C57/BL6-RAG  $-/-$  Mäuse kokultiviert. Die Milzzellen wurden vor der Kokultur mit dem Farbstoff CFSE markiert und ihre Proliferation wurde durchflußzytometrisch als Abnahme der Intensität dieses Farbstoffes gemessen. Der Farbstoff CFSE wird bei jeder Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Da nicht bekannt war, ob das Verhältnis zwischen DCs und T-Zellen die Proliferation der zytotoxischen T-Zellen beeinflußt, wurden jeweils  $1 \times 10^5$  Milzzellen mit verschiedenen DC-Zellzahlen (1:10; 1:4; 1:2 DC:Milzzellen) inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurden DCs verwendet, die nicht mit Peptid beladen wurden (Abb. 4.3 offene Kurven).

Überraschenderweise proliferierten die zytotoxischen T-Zellen (ausgefüllte Graphen) während der Kokultur mit uninfizierten DCs in Abhängigkeit von der DC-Zahl (Abb. 4.3). Dabei wurde ihre Proliferation durch eine höhere Anzahl von DCs negativ reguliert.

Nach der Kokultur der zytotoxischen T-Zellen mit Adenovirus-infizierten DCs konnte kein Unterschied in der Proliferation der T-Zellen zwischen US11- oder LacZ-exprimierenden DCs festgestellt werden. Aufgrund dieser Beobachtungen kann geschlossen werden, daß die Verminderung der MHC-Klasse-I-Moleküle auf dendritischen Zellen durch die Expression von US11 nicht ausreichend war, eine durch Zugabe eines Modellpeptides vermittelte Proliferation peptidspezifischer T-Zellen zu hemmen.

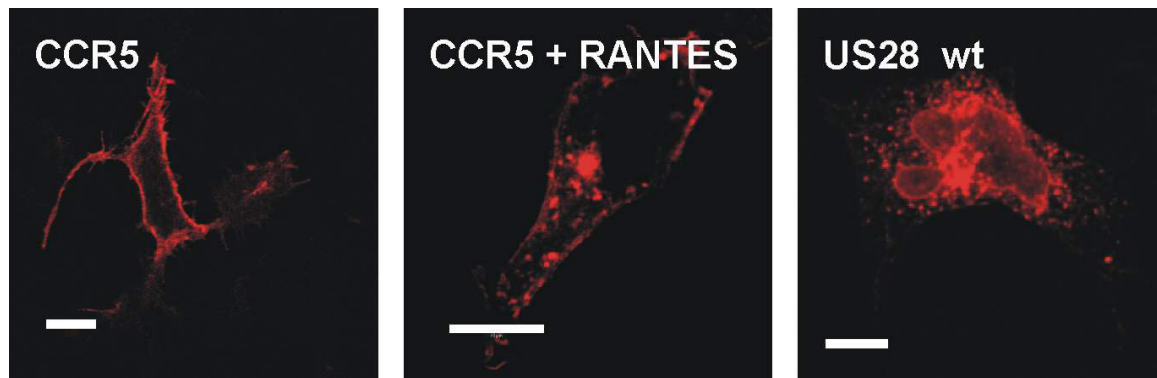
## 4.2. Molekulare Untersuchungen des US28-Rezeptors

### 4.2.1. US28 weist eine vorwiegend intrazelluläre Verteilung auf

Der US28-Rezeptor vermittelt sowohl Liganden-abhängig als auch Liganden-unabhängig die Aktivierung zellulärer Signalwege. Dies erfordert die Expression des Rezeptors an der Zelloberfläche. Überraschenderweise konnte jedoch in mikroskopischen Untersuchungen nur eine intrazelluläre Lokalisation des US28-Rezeptors in HEK293A-Zellen beobachtet werden.

Untersuchungen am humanen RANTES-Rezeptor CCR5 und an weiteren GPCRs zeigten, daß diese Rezeptoren im unstimulierten Zustand eine Verteilung vorwiegend an der Zelloberfläche aufweisen. Die Stimulation mit dem Liganden RANTES bewirkte jedoch eine Umlagerung des CCR5-Rezeptors in vesikuläre Strukturen in der Zelle (Abb. 4.4). Ebenso wie CCR5 nach der Stimulation mit seinem Liganden befindet sich der unstimulierte US28-Rezeptor vorwiegend in intrazellulären Vesikeln. Desweiteren wurde eine Lokalisation des US28-Rezeptors in anderen kernnahen Kompartimenten der Zelle gefunden (Abb. 4.4). Diese Kompartimente können möglicherweise das endoplasmatische Retikulum (ER) oder den Golgiapparat darstellen. Eine Lokalisation des US28-Rezeptors an der Zellmembran konnte mikroskopisch jedoch nicht beobachtet werden.

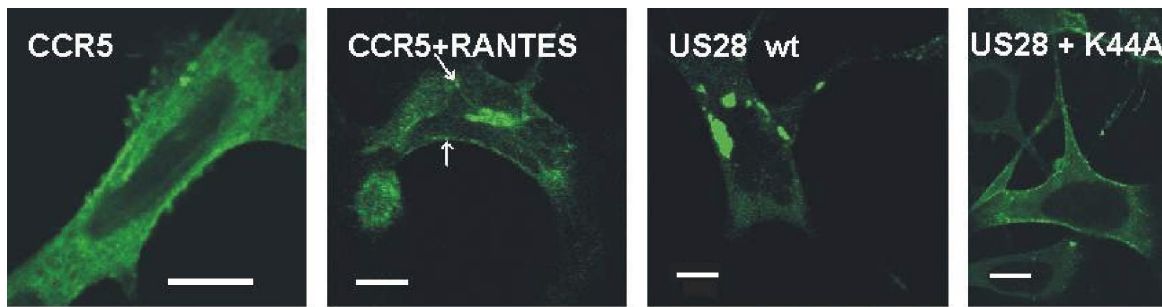
Eine vergleichbare Beobachtung der vorwiegend intrazellulären Verteilung des US28-Rezeptors wurde mit Hilfe von US28-GFP- oder US28-CD4-Fusionsproteinen gemacht (Fraile-Ramos *et al.*, 2001). Mit Hilfe dieser US28-CD4-Fusionsproteine konnte zusätzlich eine konstitutive Internalisierung (ohne Liganden) des US28-Rezeptors gezeigt werden, die als grundlegender Mechanismus des vorwiegend intrazellulären Vorkommens angenommen wird.



**Abb. 4.4. Der US28-Rezeptor weist eine vorwiegend intrazelluläre, vesikuläre Verteilung auf.** Konfokale Mikroskopie von HEK293A-Zellen 36 h nach der Transfektion mit dem humanen Chemokinrezeptor CCR5 oder mit US28. Die transfizierten Zellen wurden vor der Färbung mit einem Rezeptor-spezifischen Antikörper für 30 min mit 30 nM RANTES bei 37 °C stimuliert oder blieben unstimuliert. Danach wurden sie in 5% PFA fixiert und in Anwesenheit von 0,05% Saponin mit den Antikörpern Tub-6 für den US28-Rezeptor und Maus-anti-CCR5 Antikörper gefärbt. Der Maßstab entspricht 10  $\mu$ m.

#### 4.2.2. US28 vermittelt eine konstitutive Umlagerung von $\beta$ -Arrestin-2-GFP in vesikuläre Strukturen

Da die konstitutive Internalisierung des US28-Rezeptors als Ursache für eine vorwiegend intrazelluläre Verteilung angenommen wird, sollten die molekularen Mechanismen der Internalisierung des US28-Rezeptors untersucht werden. Viele GPCRs internalisieren über Clathrin-umhüllte Vesikel (CCV). Dabei bewirkt die Aktivierung des Rezeptors durch seinen Liganden seine Phosphorylierung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK), wodurch die Affinität des Rezeptors für Arrestin-Moleküle erhöht wird. Arrestin-Moleküle vermitteln dann den Transport des Rezeptors zu bereits vorhandenen Clathrin-Bereichen, die im Anschluß mit dem Rezeptor internalisiert werden. Für den Chemokinrezeptor CCR5 wurde bereits eine  $\beta$ -Arrestin-abhängige Internalisierung beschrieben (Aramori *et al.*, 1997). Die Analyse fixierter und permeabilisierter HEK293A-Zellen nach Kotransfektion von CCR5 und  $\beta$ -Arrestin ergab eine zytoplasmatische Verteilung von  $\beta$ -Arrestin in unstimulierten Zellen. Die Stimulation mit 30 nM RANTES führte zu einer Umlagerung von  $\beta$ -Arrestin-2-GFP an die Plasmamembran und in intrazelluläre Vesikel (Abb. 4.5.). Im Gegensatz zu CCR5 kotransfizierten Zellen befand sich  $\beta$ -Arrestin-2-GFP in den mit US28-Rezeptor transfizierten Zellen konstitutiv, d.h. ohne externe Stimulation durch einen Liganden, in vesikulären Strukturen. In einigen Zellen



**Abb. 4.5. US28 vermittelt eine konstitutive Umlagerung von  $\beta$ -Arrestin in vesikuläre Strukturen.** HEK293A-Zellen wurden mit  $\beta$ -Arrestin-2-GFP und CCR5, US28 wt oder US28 wt und Dynamin K44A kotransfiziert. 36 h nach der Transfektion wurden CCR5 transfizierte Zellen mit 30 nM RANTES für 30 min bei 37°C stimuliert oder blieben unstimuliert. Gezeigt ist die subzelluläre Lokalisation von  $\beta$ -Arrestin-2-GFP und Rezeptor kotransfizierten Zellen. Die Pfeile weisen auf vesikuläre Strukturen hin. Der Maßstab entspricht 10  $\mu$ m.

konnte eine Akkumulation von  $\beta$ -Arrestin-GFP in größeren Kompartimenten in der Zelle beobachtet werden (Abb. 4.5.). Diese Kompartimente können möglicherweise Recyclingendosomen darstellen. Da aus den mikroskopischen Beobachtungen nicht geschlossen werden konnte, ob der US28-Rezeptor die Umlagerung der  $\beta$ -Arrestin-Moleküle ebenso wie CCR5 über die Internalisierung von der Plasmamembran vermittelt, wurde eine dominant negative Mutante für Dynamin, Dynamin K44A, kotransfiziert. Diese Mutante verhindert die vom wt vermittelte Abschnürung der Clathrin-Vesikel von der Plasmamembran. Die Kotransfektion der Dynamin Mutante K44A bewirkte eine Anreicherung von  $\beta$ -Arrestin-2-GFP an der Plasmamembran (Abb. 4.5.). Somit kann geschlossen werden, daß die Umlagerung der  $\beta$ -Arrestin-Moleküle in vesikuläre Strukturen ebenso wie bei CCR5 über die Plasmamembran vermittelt wird.

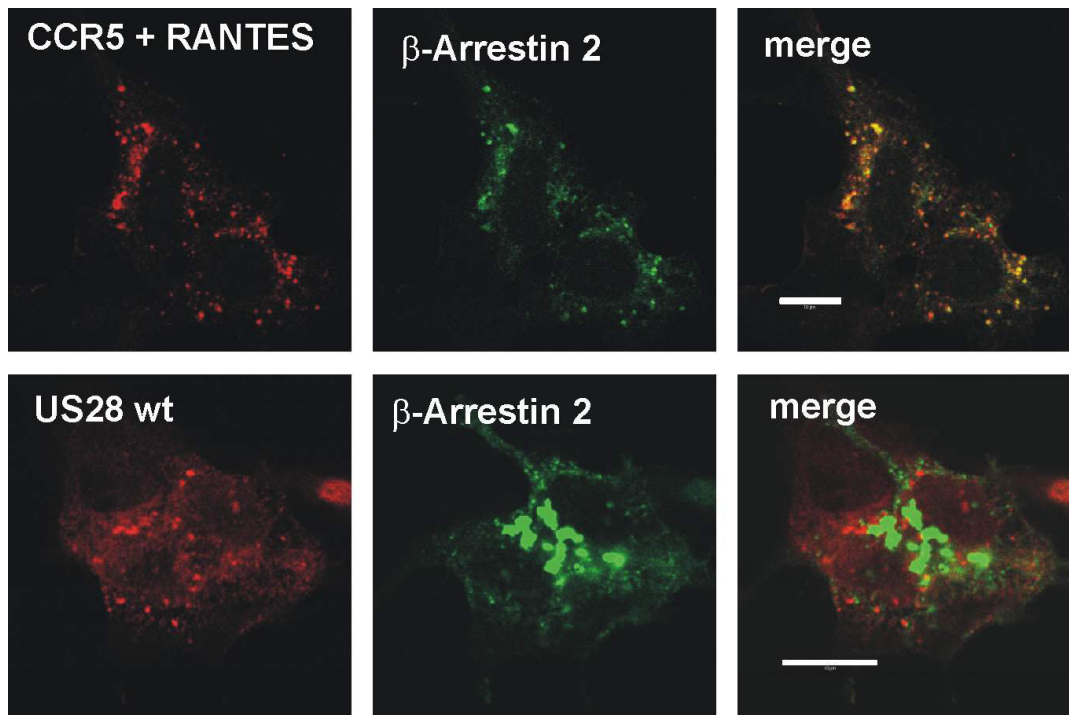
#### **4.2.3. US28 und $\beta$ -Arrestin-2-GFP befinden sich in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten**

$\beta$ -Arrestin-Moleküle wirken als Adaptermoleküle, die den aktivierten Rezeptor mit Komponenten der Endozytosemaschinerie wie AP-2 und Clathrin verbinden. Weiterhin regulieren sie die Zeitspanne, in welcher der internalisierte Rezeptor dephosphoryliert wird und wieder zurück an die Plasmamembran recycelt (Shenoy und Lefkowitz, 2003; Shenoy *et al.*, 2001). Basierend auf dem Bindungsvermögen an die unterschiedlichen Arrestin-Moleküle können

GPCRs in zwei Gruppen eingeteilt werden. Klasse-A-Rezeptoren ( $\mu$ -opioid-,  $\beta_2$ - und  $\alpha_{1b}$ -adrenerger, Endothelin A- und Dopamin-D1A-Rezeptor) besitzen eine höhere Affinität zu  $\beta$ -Arrestin-2-Molekülen als zu  $\beta$ -Arrestin-1-Molekülen. Bei diesen Rezeptoren vermitteln Arrestin-Moleküle die Internalisierung des Rezeptors, dissoziieren aber vom Rezeptor während der Internalisierung oder bereits an der Plasmamembran. Im Gegensatz dazu binden Klasse-B-Rezeptoren (Substanz P-, Angiotensin AT<sub>1A</sub>-, Neurotensin 1- und Vasopressinrezeptor 2) an  $\beta$ -Arrestin-1- und  $\beta$ -Arrestin-2-Moleküle mit gleicher Affinität. Diese Rezeptoren internalisieren als Einheit mit den  $\beta$ -Arrestin-Molekülen in Endosomen (Oakley *et al.*, 2001; Oakley *et al.*, 2000). Um eine mögliche Wechselwirkung des US28-Rezeptors und  $\beta$ -Arrestin-2-GFP zu untersuchen, wurden HEK293A-Zellen mit der cDNA beider Moleküle kotransfiziert und ihre Verteilung in der Zelle mittels konfokaler Mikroskopie beobachtet. Dabei wurde der humane Chemokinrezeptor CCR5 als Kontrolle verwendet, da bekannt war, daß er Arrestin-abhängig internalisiert (Aramori *et al.*, 1997). 36 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert und die Rezeptoren durch Antikörper nachgewiesen. In CCR5-transfizierten Zellen konnte wie erwartet nach Stimulation mit dem Liganden RANTES eine Kolokalisation von Rezeptor und  $\beta$ -Arrestin-2-GFP nachgewiesen werden (Abb. 4.6). Die Kolokalisation des Rezeptors (rot) und  $\beta$ -Arrestin-2-GFP (grün) ist in der Überlagerung der Abbildung durch gelb gefärbte Strukturen erkennbar (Abb. 4.6 merge). Im Gegensatz dazu konnte eine Kolokalisation des US28-Rezeptors und  $\beta$ -Arrestin-2-GFP-Molekülen nicht beobachtet werden.

#### **4.2.4. Herstellung der phosphorylierungsdefizienten Mutanten**

Zahlreiche GPCRs internalisieren abhängig von Arrestin-Molekülen über CCV. Die Voraussetzung für die Bindung des Rezeptors an Arrestin-Moleküle ist eine Phosphorylierung C-terminaler Phosphoakzeptorstellen durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) oder durch sogenannte second messenger Kinasen wie PKC oder PKA (siehe Übersichten in Luttrell und Lefkowitz, 2002; Ferguson, 2001). Für den Chemokinrezeptor CCR5 konnte kürzlich gezeigt werden, daß mindestens drei der vier C-terminalen Serinreste phosphoryliert sein müssen, um nach Stimulation mit dem Liganden die Umlagerung von  $\beta$ -Arrestin zur Plasmamembran und damit die Internalisierung des Rezeptors zu bewirken (Hüttenrauch *et al.*, 2002). Als mögliche Ursache für die konstitutive Umlagerung von  $\beta$ -Arrestin-Molekülen an

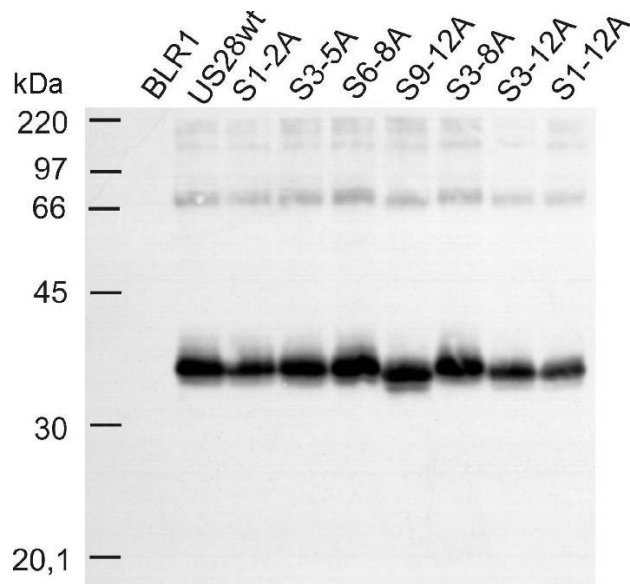


**Abb. 4.6. Fehlende Kolokalisation zwischen dem US28-Rezeptor und  $\beta$ -Arrestin-2-GFP.** Konfokale Mikroskopie von HEK293A-Zellen 36 h nach der Kotretransfektion von  $\beta$ -Arrestin-2-GFP (grün), CCR5 oder US28 (rot). Die CCR5-transfizierten Zellen wurden vor der Färbung mit dem Maus anti-CCR5-Antikörper für 30 min bei 37 °C mit 30 nM RANTES stimuliert. Die Immunfärbung des US28-Rezeptors erfolgte durch den US28 spezifischen Antikörper Tub-06. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente für den US28-Rezeptor. Der Maßstab entspricht 10  $\mu$ m.

<b>US28 wt</b>	FVGTKFRQELHCLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMFSRRSSPSRRETSSDTLSDEACRVSQIIP
<b>S1-2A</b>	FVGTKFRQELHCLLAEFRQRLFARDVAWYHSMFSRRSSPSRRETSSDTLSDEACRVSQIIP
<b>S3-5A</b>	FVGTKFRQELHCLLAEFRQRLFSRDVSWYHAMAFARRSSPSRRETSSDTLSDEACRVSQIIP
<b>S6-8A</b>	FVGTKFRQELHCLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMFSRRAAPARRETSSDTLSDEACRVSQIIP
<b>S9-12A</b>	FVGTKFRQELHCLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMFSRRSSPSRRETAADTLADEACRVAQIIP
<b>S3-8A</b>	FVGTKFRQELHCLLAEFRQRLFSRDVSWYHAMAFARRAAPARRETSSDTLSDEACRVSQIIP
<b>S3-12A</b>	FVGTKFRQELHCLLAEFRQRLFSRDVSWYHAMAFARRAAPARRETAADTLADEACRVAQIIP
<b>S1-12A</b>	FVGTKFRQELHCLLAEFRQRLFARDVAWYHAMAFARRAAPARRETAADTLADEACRVAQIIP

**Abb. 4.7. Schematische Darstellung der C-terminalen Aminosäuresequenz des US28-Rezeptors.** Die 12 Serinreste wurden aufeinanderfolgend von 1-12 nummeriert und in den verschiedenen Gruppen (grau unterlegt) durch Alaninreste ersetzt.

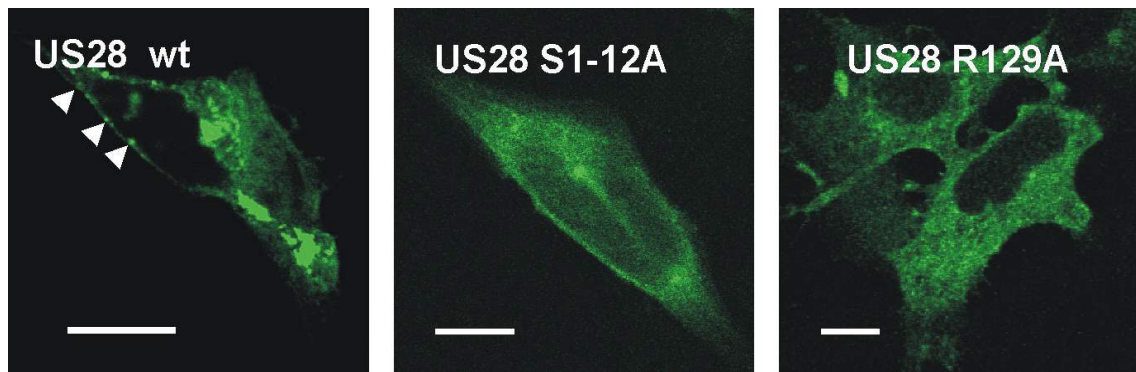




**Abb. 4.8. Der Austausch der C-terminalen Serinreste beeinflusst das Migrationsverhalten des Rezeptors in der SDS-PAGE.** HEK293A-Zellen wurden mit CXCR5, US28 wt, US28 S1-2A, US28 S3-5A, US28 S6-8A, US28 S9-12A, US28 S3-8A, US28 S3-12A und US28 S1-12A transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen in TX-100-haltigem Puffer lysiert und auf ein 12,5 %-iges SDS-PAGE-Gel geladen. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und anschließend wurde die US28-Expression mit dem mAk Tub-45 in einer Immunfärbung analysiert.

die Plasmamembran sowie ihre anschließende Umlagerung in vesikuläre Strukturen durch den US28-Rezeptor kann die konstitutive Phosphorylierung des US28-Rezeptors angesehen werden. Diese wurde in Kooperation mit Thilo Mokros untersucht (Mokros *et al.*, 2002; Mokros, 2004).

Um den Einfluß der C-terminalen Phosphorylierungsstellen des US28-Rezeptors auf die Umverteilung der  $\beta$ -Arrestin-Moleküle zu untersuchen, sollten Mutanten hergestellt werden, die nicht mehr phosphoryliert werden. Aufgrund der Phosphoaminosäureanalyse konnte eine Phosphorylierung von Tyrosinresten ausgeschlossen werden (Mokros *et al.*, 2002). Der C-Terminus des US28-Rezeptors enthält 12 Serin- und 2 Threoninreste, die in Gruppen ausgetauscht wurden. Dabei wurde die Mutante, bei der die ersten beiden Serinreste durch Alaninreste ersetzt waren, als S1-2A bezeichnet und alle weiteren entsprechend benannt (Abb. 4.7). Posttranslationale Modifikationen wie die Rezeptor-Phosphorylierung können das Laufverhalten von Proteinen in Acrylamidgelen beeinflussen. Um einen Hinweis auf die realisierten Phosphorylierungsstellen zu bekommen, wurden HEK293A-Zellen mit US28 wt und den verschiedenen Mutanten transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden sie in TX-100-haltigem



**Abb. 4.9.** Die C-terminale Phosphorylierung des US28-Rezeptors und das konservierte DRY-Motiv regulieren die Umlagerung von  $\beta$ -Arrestin-2-GFP in vesikuläre Strukturen. Konfokale Mikroskopie von HEK293A-Zellen 36 h nach der Transfektion mit  $\beta$ -Arrestin-2-GFP und US28 wt, US28 S1-12A oder US28 R129A. Dargestellt ist die subzelluläre Lokalisation von  $\beta$ -Arrestin-2-GFP Rezeptor-kotransfizierten Zellen. Der Maßstab entspricht 10  $\mu$ m.

Puffer lysiert und auf eine SDS-PAGE geladen. Mittels eines Immunblots wurden die US28-spezifischen Banden sichtbar gemacht. Die Mutante US28 S9-12A migrierte schneller als die US28 wt Bande, wodurch eine starke Verminderung der Phosphorylierung dieser Mutante sowie der darauf basierenden Varianten (vgl. Abb. 4.7.) vermutet werden konnte (Abb. 4.8). Dieser erste Hinweis wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Mokros bestätigt, da bei der metabolischen Markierung mit [ $^{32}$ P] der US28-Varianten nach Überexpression in HEK293A-Zellen diese Mutanten neben der US28 STA-Mutante den geringsten Einbau von [ $^{32}$ P] aufwiesen (Mokros *et al.*, 2002).

#### **4.2.5. Die durch den US28-Rezeptor vermittelte Umlagerung von Arrestin-Molekülen wird durch die Phosphorylierung und das DRY-Motiv bestimmt**

Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung der C-terminalen Serinreste des US28-Rezeptors die Umlagerung von  $\beta$ -Arrestin in vesikuläre Strukturen reguliert, wurden US28 wt oder die phosphorylierungsdefiziente Mutante US28 S1-12A mit  $\beta$ -Arrestin-2-GFP kotransfiziert. Die Zellen wurden 36 h nach der Transfektion fixiert und permeabilisiert und mit einem US28-spezifischen Antikörper gefärbt. Wie in der Abb. 4.9. zu sehen ist, konnte keine konstitutive Umlagerung von  $\beta$ -Arrestin-GFP in vesikuläre Strukturen durch die Kotransfektion der phosphorylierungsdefizienten Mutante US28 S1-12A beobachtet werden.

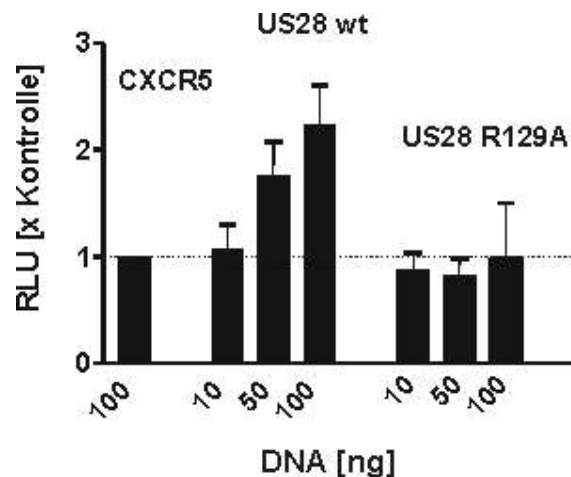
Neben der Rezeptorphosphorylierung wird die Arrestin-Bindung durch ein weiteres strukturelles Motiv von GPCRs, das DRY-Motiv, reguliert (Hüttenrauch *et al.*, 2002). Es befindet sich an der Grenze zwischen der dritten Transmembrandomäne und der zweiten intrazellulären Schleife. Um zu überprüfen, ob das DRY-Motiv des US28-Rezeptors die Arrestin-Umlagerung beeinflusst, wurde der Argininrest an Position 129 des US28-Rezeptors gegen einen Alaninrest ausgetauscht (US28 R129A). Die Mutante wurde mit  $\beta$ -Arrestin-2-GFP kotransfiziert, nach 36 h wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und der US28-Rezeptor mit dem Antikörper Tub-45 nachgewiesen. Auch bei dieser Mutante konnte im Gegensatz zum wt-Rezeptor keine Umlagerung von Arrestin-Molekülen in US28 R129A exprimierenden Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.9).

#### **4.2.6. Das DRY-Motiv reguliert die konstitutive und Liganden induzierte Signalleitung des US28-Rezeptors**

Von GPCRs, die ein DRY-Motiv besitzen, ist bekannt, daß es nicht nur ein notwendiges strukturelles Motiv für die Arrestin-Bindung ist, sondern darüber hinaus die Aktivierung von Signalkaskaden durch die Rezeptoren reguliert. Da der US28-Rezeptor sowohl konstitutiv, als auch nach Stimulation mit dem Chemokin RANTES die Aktivierung verschiedener Signalwege bewirkt, sollte der Einfluß des DRY-Motivs auf die konstitutive und Ligandenvermittelte Signalleitungsprozesse überprüft werden.

##### **4.2.6.1. Das DRY-Motiv des US28-Rezeptors reguliert die konstitutive Aktivierung von NF- $\kappa$ B**

Die transiente Expression des US28 wt-Rezeptors führt in COS-7-Zellen zu einer konstitutiven, d.h. Liganden-unabhängigen Aktivierung von NF- $\kappa$ B und Phospholipase C, die durch G-Proteine des  $G\alpha_q$ -Typs reguliert wird (Casarosa *et al.*, 2001). Um zu überprüfen, ob das DRY-Motiv des US28-Rezeptors für die konstitutive Aktivierung von NF- $\kappa$ B notwendig ist, wurde ein Luziferase-Reporter-Assay durchgeführt. Dazu wurde das Reporterplasmid 6NF- $\kappa$ Btkluc mit steigender Menge (10 ng, 50 ng, 100 ng) des US28 wt- oder US28 R129A- Plasmides kotransfiziert, wobei die Gesamtmenge der transfizierten cDNA in den einzelnen Ansätzen konstant blieb. Als Negativkontrolle wurde der humane Chemokinrezeptor CXCR5 verwendet. Verglichen mit CXCR5-transfizierten Zellen, die ohne Stimulation mit dem Liganden BCA

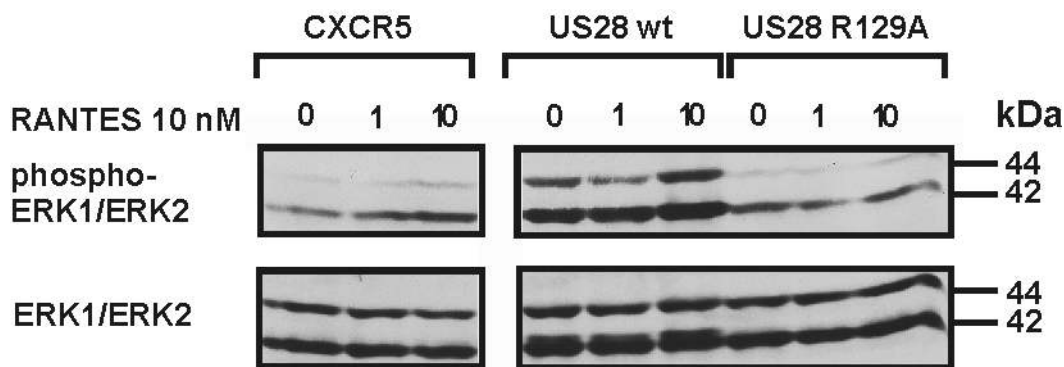


**Abb. 4.10. Die konstitutive Aktivierung von NF- $\kappa$ B wird durch das DRY-Motiv des US28-Rezeptors reguliert.** Bestimmt wurde die konstitutive Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch den US28-Rezeptor in einem dualen Luciferase Reporter Assay. HEK293A-Zellen wurden transient mit 6NF- $\kappa$ Btkuc, pRL-TK und entweder CXCR5, US28 wt oder US28 R129A transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 6 h in serumfreiem Medium kultiviert, anschließend lysiert und bis zur Messung eingefroren. Die Luciferaseaktivität wurde in einem Luminometer als Maß der NF- $\kappa$ B-abhängigen Luciferaseexpression bestimmt. Die angegebenen Werte entsprechen der relativen Luciferaseaktivität bezogen auf unstimulierte CXCR5 transfizierte Zellen. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  S.D. von drei unabhängigen Experimenten.

keine Aktivierung von NF- $\kappa$ B vermitteln, führte die Transfektion des US28 wt-Plasmids in den HEK293A-Zellen zu einer konzentrationsabhängigen Liganden-unabhängigen Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Im Gegensatz dazu konnte bei der Transfektion der US28 R129A-Mutante keine Aktivierung von NF- $\kappa$ B festgestellt werden (Abb. 4.10). Diese Beobachtungen zeigen, daß die konstitutive Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch US28 über das DRY-Motiv reguliert wird. Es kann vermutet werden, daß hierfür eine vom DRY-Motiv regulierte Kopplung von G-Proteinen an den US28-Rezeptor verantwortlich ist.

#### 4.2.6.2. Das DRY-Motiv des US28-Rezeptors vermittelt die RANTES-induzierte Aktivierung von MAPK

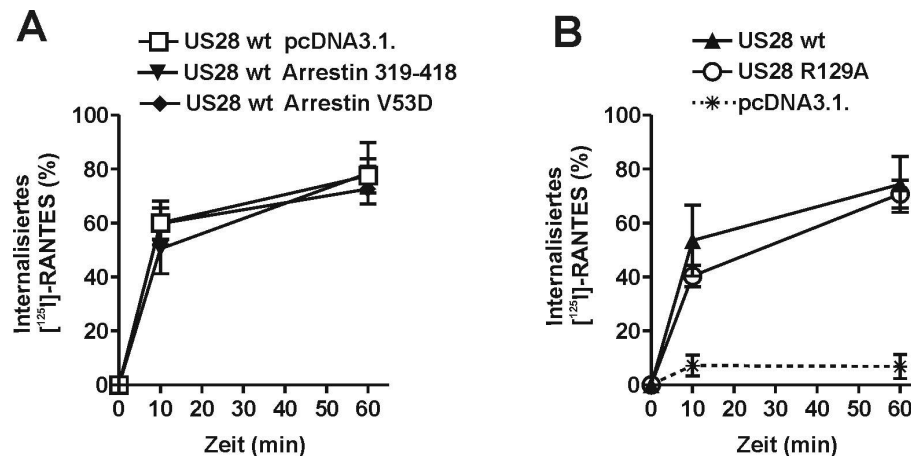
Die Stimulation des US28-Rezeptors mit seinem Liganden RANTES führt über eine Kopplung an  $G_{\alpha_i}$ - und  $G_{\alpha_{16}}$ -Proteinen zur Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinase (ERK) 2 (Billstrom *et al.*, 1998). ERK 2 gehört zur Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Ihre Aktivierung verläuft über eine Phosphorylierung der Kinasen, wodurch sie im Anschluß vom Zytoplasma in den Zellkern transportiert werden. Für eine Untersuchung der



**Abb. 4.11. Das DRY-Motiv des US28-Rezeptors vermittelt die RANTES-induzierte Aktivierung der MAPK.** Mit CXCR5, US28 wt oder US28 R129A-transfizierte HEK293A-Zellen wurden 0, 1 und 10 min mit RANTES (10 nM) stimuliert. Die Zellen wurden in SDS-PAGE-Probenpuffer aufgenommen, die Gesamtzelllysate in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Eine Aktivierung der ERK1 und ERK2 MAPK wurde durch phosphorylierungsspezifische Antikörper nachgewiesen. Diese wurden nach der Detektion entfernt und die Menge der aufgetragenen ERK1 und ERK2 Moleküle mit Hilfe von Gesamt-ERK1/ERK2-spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

US28-vermittelten Aktivierung der MAPK wurden daher Antikörper verwendet, die spezifisch die phosphorylierte Form der MAPK erkennen. Um zu überprüfen, ob das DRY-Motiv des US28-Rezeptors neben der Liganden-unabhängigen ebenfalls die Liganden-vermittelte Signalleitung reguliert, wurden HEK293A-Zellen mit US28 wt und US28 R129A transfiziert. Als Negativkontrolle wurde auch hier der humane Chemokinrezeptor CXCR5 verwendet. Die Stimulation der US28 wt-transfizierten Zellen mit 10 nM RANTES bewirkte eine Phosphorylierung von ERK 1 und ERK 2 nach 10 min, während die Stimulation von US28 R129A und CXCR5-transfizierten Zellen mit dem Chemokin RANTES zu keiner Veränderung der Phosphorylierung von ERK 1/2 führte (Abb. 4.11). Um auszuschließen, daß die fehlende Arrestin-Umlagerung bzw. Signalleitung nicht durch eine Verminderung oder ein Fehlen des Rezeptors an der Oberfläche vermittelt wird, wurde die Expression der US28 R129A-Mutante auf der Zelloberfläche durchflußzytometrisch untersucht. Dabei konnte keine Veränderung der Oberflächenexpression dieser Mutante gegenüber US28 wt-transfizierten Zellen festgestellt werden (Daten werden nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß der Argininrest 129 im konservierten DRY-Motiv des US28-Rezeptors ein notwendiges strukturelles Merkmal sowohl für die konstitutive als auch die Liganden-vermittelte Signalleitung darstellt.



**Abb. 4.12. Der US28-Rezeptor internalisiert unabhängig von  $\beta$ -Arrestin und der konstitutiven Signalleitung. HEK293A-Zellen wurden transient (A) mit US28 wt und pcDNA3.1., Arrestin 319-418 oder Arrestin V53D oder (B) mit US28 wt, US28 R129A oder pcDNA transfiziert und 2 h mit [ $^{125}$ I]-RANTES auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und für 0, 10 und 60 min auf 37°C erwärmt. Die Hälfte der Ansätze wurden lysiert und die Menge des internalisierten und an der Zelloberfläche befindlichen [ $^{125}$ I]-RANTES bestimmt (gesamtzelluläre Aktivität). Bei der anderen Hälfte der Zellen wurden das Zelloberflächen-gebundene [ $^{125}$ I]-RANTES durch Inkubation mit saurem Bindungspuffer entfernt, die Zellen lysiert und ihre Aktivität bestimmt (Säure-resistente Aktivität). Die Internalisierung wurde aus dem prozentualen Anteil der Säure-resistenten Aktivität (= internalisiert) und der gesamtzellulären Aktivität berechnet. Jeder Meßpunkt ist ein Mittelwert  $\pm$  S.D. aus drei unabhängigen Experimenten.**

#### 4.2.7. Die Internalisierung des US28-Rezeptors erfolgt unabhängig von $\beta$ -Arrestin und der konstitutiven Signalleitung

Das Entfernen inflammatorischer Chemokine aus dem Überstand infizierter Zellen durch den US28-Rezeptor stellt einen möglichen Mechanismus des HCMV dar, den zellulären Elementen der menschlichen Immunantwort zu entgehen (Billstrom *et al.*, 1999; Bodaghi *et al.*, 1998). Als molekulare Grundlage kann die kürzlich beschriebene Liganden-abhängige Endozytose des US28-Rezeptors angenommen werden (Fraile-Ramos *et al.*, 2001).

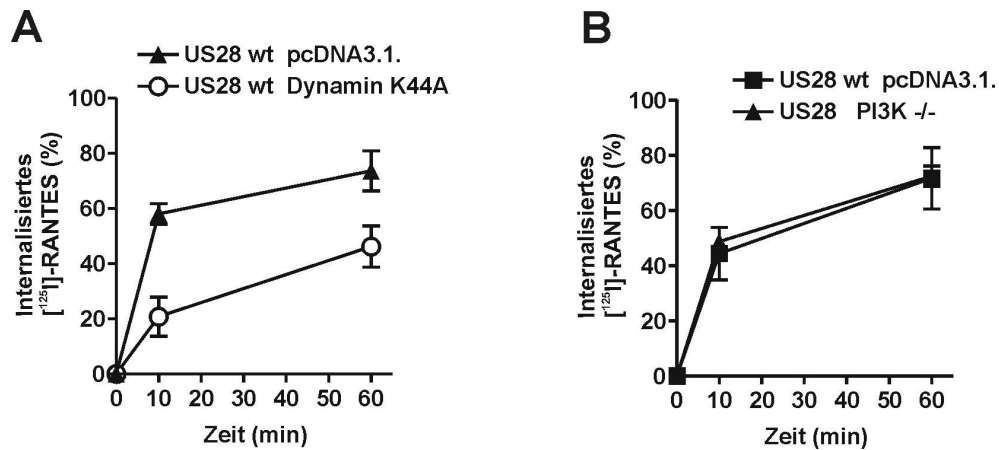
Aufgrund der Beobachtung, daß die konstitutive Phosphorylierung des US28-Rezeptors sowohl die Umlagerung von  $\beta$ -Arrestin-2 an die Plasmamembran als auch die Internalisierungsrate des Rezeptors reguliert (Mokros *et al.*, 2002), sollte überprüft werden, ob die Internalisierung des US28-Rezeptors von  $\beta$ -Arrestin-Molekülen abhängig ist. Um dies zu untersuchen, wurde US28 wt mit zwei verschiedenen dominant-negativen  $\beta$ -Arrestin-Mutanten, ArrestinV53D und Arrestin 319-418, kotransfiziert. Die Arrestin V53D-Mutante zeichnet sich durch eine erhöhte Bindung an Clathrin-Moleküle verglichen mit wt Arrestin-Molekülen aus.

Weiterhin weist sie eine verminderte Bindung an den phosphorylierten Rezeptor auf. Die verkürzte Mutante, Arrestin 319-418, wiederum enthält lediglich den Bindungsabschnitt für Clathrin. Die Internalisierung des US28-Rezeptors wurde als Aufnahme von [ $^{125}$ I]-RANTES in einem Rezeptor-Internalisierungs-Experiment untersucht. Dazu wurden HEK293A-Zellen mit US28 wt und pcDNA3.1., Arrestin V53D oder Arrestin 319-418 kotransfiziert und mit [ $^{125}$ I]-RANTES inkubiert. Anschließend wurde die Endozytose des Rezeptors für 0, 10 und 60 min ermöglicht. Die Internalisierungsrate wurde anschließend aus dem prozentualen Anteil aus aufgenommenem [ $^{125}$ I]-RANTES und dem gesamt gebundenen [ $^{125}$ I]-RANTES errechnet. Dabei wurde kein Unterschied zwischen der Internalisierung des US28-Rezeptors nach Kointransfektion mit pcDNA oder den dominant negativen Mutanten für Arrestin festgestellt (Abb. 4.12. A). Somit kann geschlossen werden, daß die Internalisierung des US28-Rezeptors unabhängig von  $\beta$ -Arrestin-Molekülen ist. Diese Beobachtung wurde kürzlich durch eine Untersuchung in Arrestin-defizienten Fibroblasten bestätigt (Fraile-Ramos *et al.*, 2003).

Allgemein bewirkt die Stimulation von GPCRs mit ihrem Liganden eine Aktivierung verschiedener Signalwege und die Internalisierung des Rezeptors. Demgegenüber hatten Untersuchungen von US28-CD4-Fusionsproteinen ergeben, daß diese auch ohne Bindung des Liganden internalisiert werden (Fraile-Ramos *et al.*, 2003). Daher sollte im Folgenden bestimmt werden, ob die konstitutive Signalleitung des US28-Rezeptors seine Internalisierung reguliert. Dazu wurden HEK293A-Zellen entweder mit US28 wt oder US28 R129A transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde auch hier die Aufnahme von [ $^{125}$ I]-RANTES in einem Rezeptor-Internalisierungs-Experiment untersucht. Auch hier konnte kein statistisch signifikanter Unterschied (t-Test) in der Aufnahme von [ $^{125}$ I]-RANTES festgestellt werden (Abb. 4.12.B). Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Internalisierung des US28-Rezeptors unabhängig von  $\beta$ -Arrestin-Molekülen oder der Signalleitung reguliert wird.

#### **4.2.8. Dynamin reguliert die Internalisierung des US28-Rezeptors**

Da die Internalisierung des US28-Rezeptors nicht durch  $\beta$ -Arrestin-Moleküle beeinflusst wird, sollten im Folgenden weitere Moleküle untersucht werden, die an der Internalisierung von GPCRs beteiligt sind. Zu diesen zählt die GTP-ase Dynamin. Sie reguliert sowohl die Abschnürung von Clathrin-umhüllten Membranbereichen als auch von Lipid-Rafts/Caveolae. Um die Bedeutung von Dynamin bei der Internalisierung des US28-Rezeptors zu untersuchen, wurde die dominant negative Mutante Dynamin K44A verwendet. Diese Mutante ist in

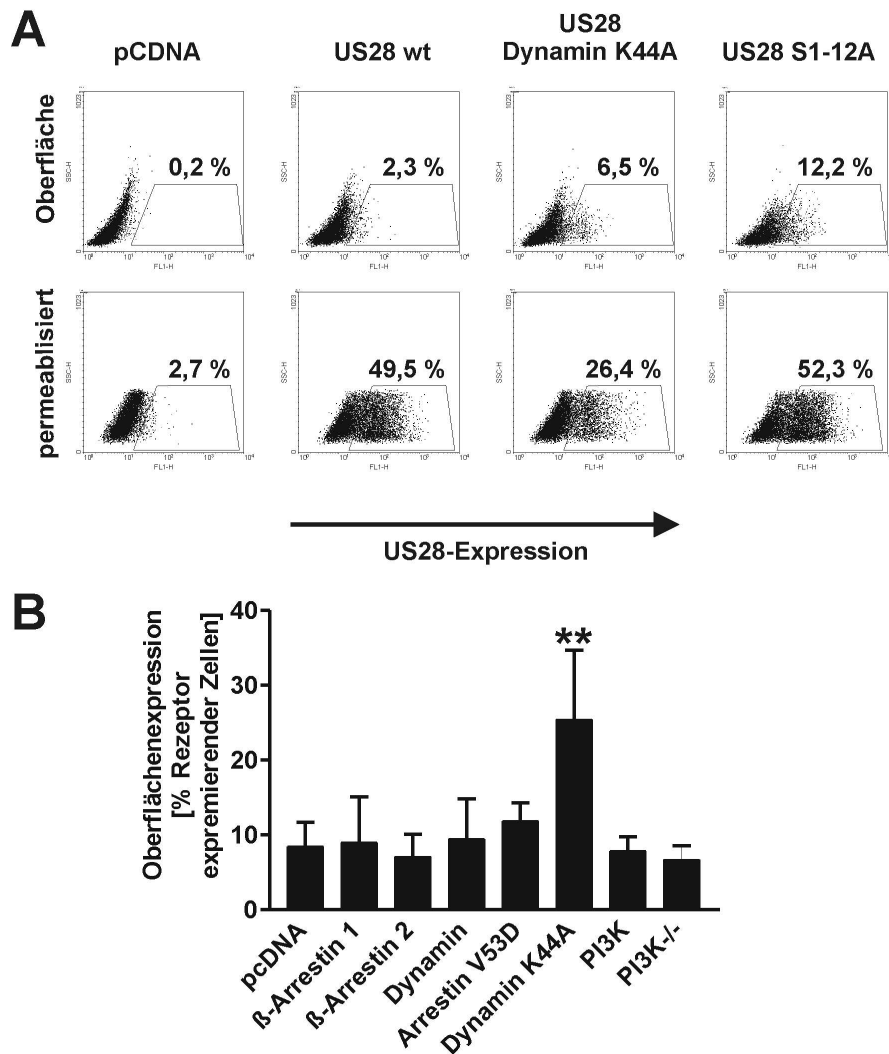


**Abb. 4.13. Dynamin reguliert die Internalisierung des US28-Rezeptors.** HEK293A-Zellen wurden transient mit US28 und (A) pcDNA oder Dynamin K44A oder (B) pcDNA oder PI3K-/- kotransfiziert. Die Endozytose des US28-Rezeptors wurde in einem Internalisierungsexperiment (siehe Abb. 4.12.) als Aufnahme von [ $^{125}$ I]-RANTES bestimmt. Jeder Meßpunkt ist der Mittelwert  $\pm$  S.D. aus drei unabhängigen Experimenten.

ihrer GTP-ase Aktivität beeinträchtigt, wodurch eine Abschnürung von Vesikeln verhindert wird. In einem Rezeptor-Internalisierungs-Experiment führte die Kotransfektion von US28 und Dynamin K44A zu einer verminderten Aufnahme von [ $^{125}$ I]-RANTES. Dabei wurden nach 10 min nur etwa 34 % und nach 60 min nur 61 % des Wertes der pcDNA3.1. und US28 kotransfizierten Ansätze erreicht (Abb. 4.13.A). Dennoch konnte die Internalisierung des US28-Rezeptors nicht vollständig gehemmt werden. Dies kann möglicherweise darauf zurückgeführt werden, daß die Menge der dominant-negativen Mutante nicht ausreichend war, um endogenes Dynamin vollständig zu hemmen. Alternativ könnten durch den Rezeptor zusätzlich weitere Dynamin-unabhängige Wege der Rezeptorendozytose benutzt werden.

Verschiedene zelluläre Effekte wie die Proliferation sowie das Rearrangement des Zytoskeletts werden durch die Stimulation von Phosphatidyl-Inosit-3-Kinasen (PI3K) nach Aktivierung einer Vielzahl von GPCRs über  $\beta\gamma$ -Proteinuntereinheiten der heterotrimeren G-Proteine reguliert. Kürzlich konnte auch ein Einfluß der PI3K auf die Internalisierung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors gezeigt werden (Naga Prasad *et al.*, 2001). Um die Internalisierung des US28-Rezeptors in Abhängigkeit der PI3K-Aktivität zu untersuchen, wurde eine dominant negative Mutante der PI3K mit dem US28-Rezeptor kotransfiziert. Bei dieser Mutante wurde die ATP-Bindungsstelle entfernt und sie kann somit nicht mehr die Bildung von Phosphatidylinosit-3,4,5-Phosphat (PtdIns3,4,5P<sub>3</sub>) katalysieren. Frühere Untersuchungen zeigten, daß die Abwesenheit von PtdIns3,4,5P<sub>3</sub> die Bindung von Arrestin-Molekülen an den AP-2-Komplex hemmt





**Abb. 4.14. Die Kotransfektion von Dynamin K44A erhöht die Zelloberflächenexpression des US28-Rezeptors.** HEK293A-Zellen wurden mit pcDNA3.1., US28 S1-12A, US28 und pcDNA3.1., β-Arrestin-1, β-Arrestin-2, Dynamin, Arrestin V53D, Dynamin K44A, PI3K, und PI3K -/- transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde die Rezeptorexpression an der Oberfläche von intakten Zellen und die Gesamtexpression an fixierten und permeabilisierten Zellen bestimmt. Die Rezeptorexpression wurde durchflußzytomtrisch durch Anfärbung des US28-Rezeptors mit dem US28-spezifischen Antikörper Tub-45 ermittelt. Es ist angegeben, bei wievielen der Rezeptor-exprimierenden Zellen eine Lokalisation an der Zelloberfläche nachgewiesen wurde. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte ± S.D. von fünf unabhängigen Experimenten. \*\*  $p \leq 0,01$  in Bezug zum US28 wt.

und somit die Internalisierung von GPCRs inhibieren kann (Gaidarov *et al.*, 1996; Gaidarov *et al.*, 1999). HEK293A-Zellen wurden mit US28 und pcDNA3.1. oder PI3K -/- kotransfiziert und die Internalisierung des Rezeptors wurde durch die Aufnahme von [ $^{125}$ I]-RANTES bestimmt. Dabei konnte kein Unterschied in der Internalisierung des US28-Rezeptors nach Kotransfektion mit der dominant negativen Mutante der PI3K festgestellt werden (Abb. 4.13.B).

#### **4.2.8.1. Die Oberflächenexpression des US28-Rezeptors wird durch Dynamin reguliert**

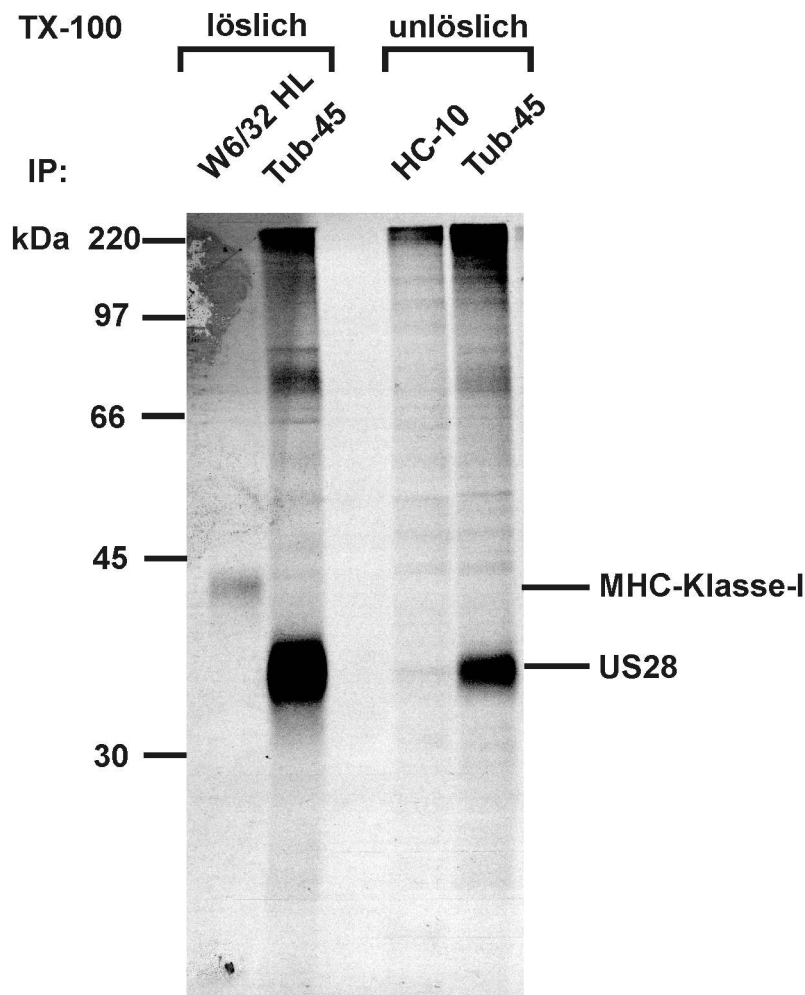
Die Kotransfektion des US28-Rezeptors mit der dominant negativen Mutante von Dynamin, Dynamin K44A, bewirkte eine verminderte Internalisierung des US28-Rezeptors. Daher sollte überprüft werden, ob sich der US28-Rezeptor infolge der Hemmung der konstitutiven Internalisierung an der Zelloberfläche anhäuft. Dazu wurde US28 wt mit Dynamin K44A kotransfiziert und die Expressionsrate des Rezeptors an der Zelloberfläche von allen US28-exprimierenden Zellen durchflußzytometrisch bestimmt. Dazu wurde die Hälfte der Zellen 48 h nach der Transfektion fixiert und permeabilisiert, während die Messung der Expression des US28-Rezeptors an der Zelloberfläche an lebenden Zellen durchgeführt wurde. Als Kontrolle für die spezifische Bindung der Antikörper wurden Zellen verwendet, die nur pcDNA3.1. transfiziert wurden. Als Positivkontrolle für eine erhöhte Expression des US28-Rezeptors an der Oberfläche wurde die phosphorylierungsdefiziente Mutante US28 S1-12A verwendet. Wie die Abb. 4.14. A und B zeigen, waren in US28 wt und pcDNA3.1. kotransfizierten Zellen durchschnittlich nur 8 % S.D.  $\pm$  3,2 des Rezeptors an der Oberfläche nachweisbar.

Die Kotransfektion des US28-Rezeptors mit der dominant negativen Mutante, Dynamin K44A, bewirkte eine Zunahme der Expression des US28-Rezeptors auf der Zelloberfläche auf durchschnittlich 25 % S.D.  $\pm$  9,2 (siehe Abb. 4.14.B). Alle anderen Adaptermoleküle oder dominant-negativen Mutanten waren an der Regulation der Oberflächenexpression des US28-Rezeptors nicht beteiligt und bestätigten somit die Daten der Internalisierung.

#### **4.2.9. US28 befindet sich in der Detergenz-unlöslichen Zellfraktion**

Die Untersuchungen der Zelloberflächenexpression und der Internalisierung des US28-Rezeptors ergaben, daß beide Prozesse durch Dynamin reguliert werden. Da Dynamin neben dem Clathrin-abhängigen auch an dem Lipid-Raft/Caveolae-abhängigen Weg der Rezeptorinternalisierung beteiligt ist, sollte im Folgenden untersucht werden, auf welchem der beiden Wege US28 endozytiert wird.

Dazu wurde zunächst die subzelluläre Verteilung des US28-Rezeptors bestimmt. Lipid-Rafts/Caveolae sind in nicht-ionischen Detergenzien wie TX-100 unlöslich und zeichnen sich durch einen hohen Anteil von Cholesterin und Sphingophospholipiden aus. Caveolae gehören zur Gruppe der Lipid-Rafts und sind zusätzlich durch das Vorkommen von Caveolin 1 charakterisiert (Anderson, 1998; Kurzchalia und Parton, 1999).



**Abb. 4.15.** Der US28-Rezeptor ist sowohl mit der Detergenz-löslichen als auch in der Detergenz-unlöslichen Zellfraktion nachweisbar. HEK293A-Zellen wurden mit US28 transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit [ $^{35}$ S]-Methionin und [ $^{35}$ S]-Cystein markiert, in TX-100-haltigem Lysepuffer aufgenommen, unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert, die löslichen Bestandteile wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die unlöslichen Bestandteile in SDS-haltigem Puffer gelöst. Der US28-Rezeptor und MHC-Klasse-I-Moleküle wurden aus den Zellsolubilisaten mit den Antikörpern Tub-06 (US28), HC10 und W6/32HL (MHC-Klasse-I-Moleküle) immunpräzipitiert und in einer SDS-PAGE analysiert. Die gezeigte Autoradiographie ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Um zu untersuchen, ob sich US28 in der Detergenz-unlöslichen Fraktion befindet, wurden zunächst HEK293A-Zellen mit US28 transfiziert und 48 h nach der Transfektion mit [ $^{35}$ S]-Methionin/Cystein markiert. Die Zellen wurden in einem TX-100-haltigen Puffer lysiert und unlösliche Bestandteile abzentrifugiert. Das entstandene Pellet, die Detergenz-unlösliche Fraktion, wurde in 1%-igem SDS-Puffer und durch Erhitzen auf 95 °C gelöst. Anschließend wurde US28 aus dem TX-100-Lysat und aus der in SDS-Puffer gelösten Pelletfraktion immunpräzipitiert. Als Kontrolle wurden MHC-Klasse-I-Moleküle verwendet, die keine

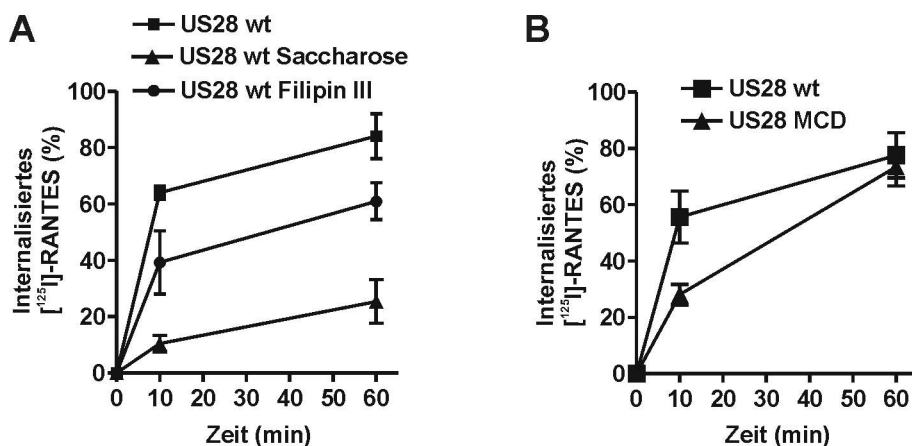


**Abb. 4.16. Caveolin 1 und der US28-Rezeptor kolokalisieren nicht miteinander.** Konfokale Mikroskopie der intrazellulären Verteilung von Caveolin 1 und dem US28-Rezeptor in US28-transfizierten Zellen. Die Immunfärbung erfolgte 36 h nach der Transfektion mit mAk Tub-06 für US28 und einem polyklonalen Kaninchenserum für endogenes Caveolin 1. Die Daten repräsentieren drei unabhängige Experimente. Der Maßstab entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Bestandteile von Caveolae/Lipid-Rafts sind und sich daher ausschließlich in der TX-100-löslichen Fraktion befinden. Wie die Abbildung 4.13. zeigt, konnte US28 im Gegensatz zu MHC-Klasse-I-Molekülen jedoch in beiden Fraktionen nachgewiesen werden. Diese Beobachtung deutete an, daß US28 sowohl über Clathrin-abhängige (TX-100 löslich), als auch über Lipid-Raft/Caveolae-vermittelte (TX-100 unlöslich) Endozytosewege in die Zelle aufgenommen werden kann.

#### 4.2.10. US28 und Caveolin 1 befinden sich in unterschiedlichen Kompartimenten

Das Vorkommen von Proteinen in der Detergenz-unlöslichen Fraktion kann nicht als unmittelbarer Beweis für die Assoziation mit Caveolae angesehen werden, sondern kann auch durch eine Wechselwirkung des US28-Rezeptors mit dem Aktinskelett erklärt werden (Avalos *et al.*, 1997; Sanderson *et al.*, 1995). Deshalb sollte ein mögliches Vorkommen des US28-Rezeptors und Caveolin 1 in gemeinsamen Kompartimenten untersucht werden. Dazu wurden HEK293A-Zellen mit US28 transfiziert, 36 h nach der Transfektion fixiert, permeabilisiert und der US28-Rezeptor sowie endogenes Caveolin 1 mit Hilfe von spezifischen Antikörpern angefärbt. Wie die Abb. 4.16. zeigt, konnte keine Kolokalisation des US28-Rezeptors mit Caveolin 1 gefunden werden, was den Caveolaeweg als Hauptweg der US28-Internalisierung unwahrscheinlich erscheinen läßt.



**Abb. 4.17. Die Internalisierung des US28-Rezeptors wird vorwiegend durch den Clathrin-Weg beeinflusst.** HEK293A-Zellen wurden transient mit US28 transfiziert und (A) mit Medium, 0,4 M Sucrose, 5 µg/ml Filipin III oder (B) Medium, 5 mM MCD inkubiert. Die Endozytose des US28-Rezeptors wurde in einem Internalisierungsexperiment (siehe Abb. 4.12.) als Aufnahme von [ $^{125}$ I]-RANTES bestimmt. Jeder Meßpunkt ist der Mittelwert  $\pm$  S.D. aus drei unabhängigen Experimenten.

#### 4.2.11. Die Internalisierung des US28-Rezeptors wird durch Filipin III und hyperosmolare Saccharose gehemmt

Kürzlich wurde in einigen Untersuchungen die Relevanz von Lipid-Rafts/Caveolae für die Internalisierung von GPCRs wie CCR5 oder den B2-Bradikininrezeptor nachgewiesen (Lamb *et al.*, 2002; Mueller *et al.*, 2002).

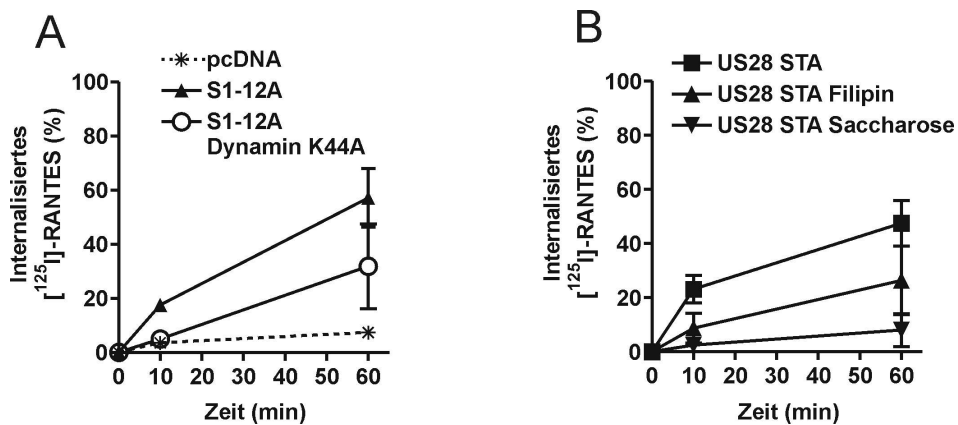
Um eine Beteiligung von Lipid-Rafts bei der Endozytose des US28-Rezeptors zu untersuchen, wurden pharmakologische Inhibitoren verwendet, die mit dem Hauptbestandteil von Lipid-Rafts, dem Cholesterin, in Wechselwirkung treten. Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (MCD) entfernt Cholesterin aus Membranen und beeinflusst somit neben der Lipid-Raft-abhängigen Endozytose ebenso konzentrationsabhängig eine Internalisierung über den Clathrin-Weg (Rodal *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu bindet Filipin das Cholesterin in der Membran und beeinflusst somit selektiv die Lipid-Raft-abhängige Endozytose.

In Internalisierungsexperimenten des US28-Rezeptors führte die Inkubation Rezeptor-transfizierter Zellen mit Filipin (5 µg/ml) zu einer partiellen Hemmung der Aufnahme von [ $^{125}$ I]-RANTES (10 min unbehandelt 69,2 % und Filipin 39,3%; 60 min unbehandelt 84,1% und Filipin 61%), während eine Inkubation mit 5 mM MCD nur frühe Zeitpunkte der Internalisierung (10 min unbehandelt 55,6 % und MCD 28,1%) beeinflusste (Abb. 4.17). Da der Einsatz der pharmakologischen Inhibitoren der Lipid-Raft-abhängigen Endozytose nur eine par-

tielle Verminderung der Internalisierung des US28-Rezeptors bewirkte, wurde daraufhin untersucht, ob der US28-Rezeptor ebenfalls über CCV internalisiert. Die Clathrin-abhängige US28-Internalisierung wurde durch die Inkubation US28-transfizierter Zellen mit hyperosmolarer Saccharose-Lösung untersucht. Im Gegensatz zur Hemmung des Caveolae-Weges konnte nach der Inkubation mit 0,4 M Saccharose-Lösung eine starke Verminderung der [ $^{125}$ I]-RANTES-Aufnahme (10 min unbehandelt 69,2 % und Saccharose 10,4 %; 60 min unbehandelt 84,4 % und Saccharose 25%) festgestellt werden. Aufgrund der vorliegenden Daten kann davon ausgegangen werden, daß die Internalisierung des US28-Rezeptors vorwiegend durch den Clathrin-Weg stattfindet, eine Internalisierung durch Lipid-Raft-assoziierte Wege aber auch zu einem geringen Ausmaß beteiligt ist.

#### **4.2.12. Die Internalisierung der phosphorylierungsdefizienten Mutante folgt den gleichen Wegen wie der wt-Rezeptor**

Der Austausch der Phosphoakzeptorstellen des US28-Rezeptors durch Alaninreste bewirkte eine partielle Hemmung der Internalisierung des US28-Rezeptors. Diese Verminderung der Rezeptorendozytose kann jedoch nicht wie bei anderen phosphorylierungsdefizienten Mutanten verschiedener GPCRs durch eine fehlende Bindung von Arrestin-Molekülen an den Rezeptor erklärt werden, da der US28-Rezeptor unabhängig von Arrestin-Molekülen internalisiert. Es wurde daher untersucht, ob die unterschiedliche Kinetik der Internalisierung des wt-Rezeptors und der phosphorylierungsdefizienten Mutante durch unterschiedliche Internalisierungswege vermittelt wird. Zunächst wurde geprüft, ob die Internalisierung der phosphorylierungsdefizienten Mutante US28 S1-12A ebenfalls von der GTP-ase Dynamin abhängig ist. Dazu wurde US28 S1-12A mit der GTP-ase-defizienten Mutante Dynamin K44A kotransfiziert. Diese Kotransfektion bewirkte eine um 28 % (10 min) bzw. 55,7 % (60 min) verminderte Aufnahme von [ $^{125}$ I]-RANTES gegenüber pcDNA3.1./US28 S1-12A kotransfizierten Zellen (Abb. 4.18A). Diese Daten zeigen, daß die Internalisierung des phosphorylierten und des nicht phosphorylierten Rezeptors in gleicher Weise von Dynamin abhängig waren. Die Inkubation US28 STA-transfizierter Zellen mit den Inhibitoren Filipin und Saccharose ergab ebenfalls eine Verminderung der Internalisierung (10 min unbehandelt 23,1 % , Filipin 8,7 % und Saccharose 2,5 % sowie 60 min unbehandelt 47,5 %, Filipin 26,4 % und Saccharose 8 % siehe Abb. 4.18.B ). Somit wird auch der nicht phosphorylierte Rezeptor ähnlich wie der wt-Rezeptor ebenfalls überwiegend auf dem Clathrin-Weg internalisiert.

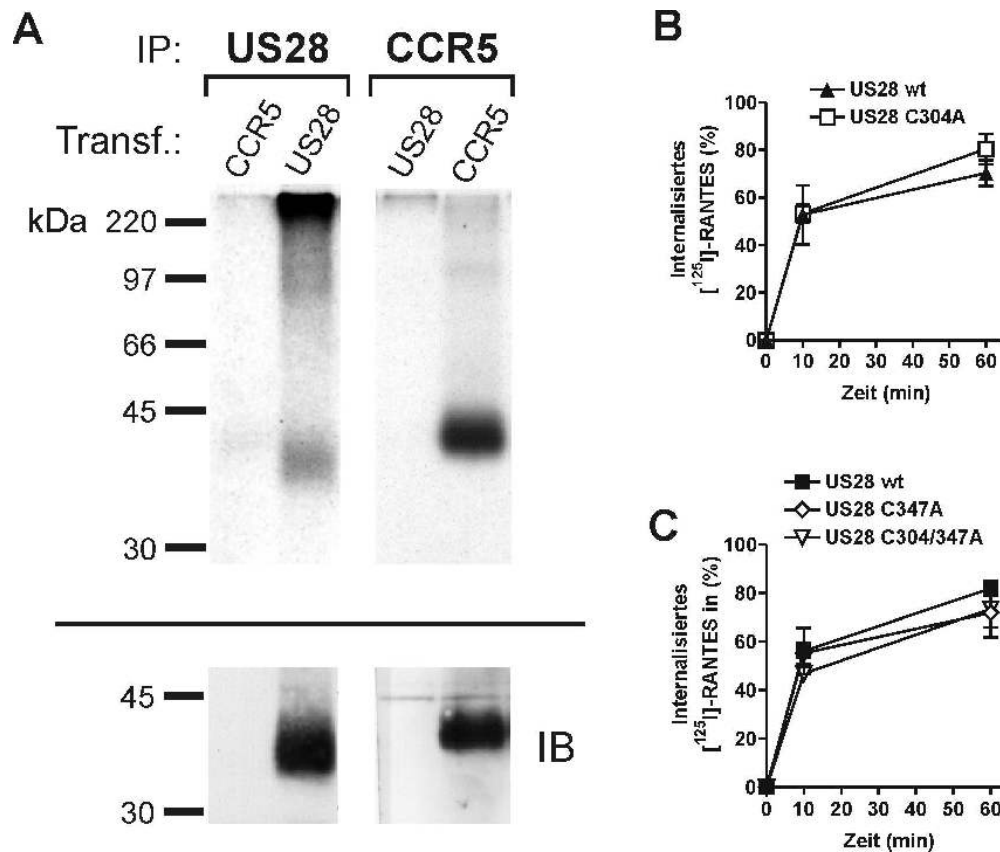


**Abb. 4.18.** Die Internalisierung der phosphorylierungsdefizienten Mutante US28 STA wird vorwiegend durch den Clathrin-Weg beeinflusst. HEK293A-Zellen wurden transient mit US28 STA transfiziert und (A) mit der GTP-ase defizienten Mutante Dynamin K44A oder pcDNA3.1. kotransfiziert oder (B) mit Medium, 0,4 M Saccharose, 5 µg/ml Filipin III inkubiert. Die Endozytose des US28-Rezeptors wurde in einem Internalisierungsexperiment (siehe Abb. 4.12.) als Aufnahme von [ $^{125}$ I]- RANTES bestimmt. Jeder Meßpunkt ist der Mittelwert  $\pm$  S.D. aus zwei unabhängigen Experimenten.

#### 4.2.13. Die Endozytose des US28-Rezeptors wird unabhängig von der Palmitylierung des C-Terminus reguliert

Neben der Phosphorylierung des Rezeptors sind für GPCRs weitere strukturelle Motive beschrieben, die eine Rezeptorendozytose regulieren. So kann die Palmitylierung C-terminaler Cysteinreste von GPCRs die Ausbildung einer vierten intrazellulären Schleife bewirken und damit die Anlagerung von G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRKs) oder  $\beta$ -Arrestin-Molekülen verstärken und so die Internalisierung der Rezeptoren fördern (Bjorklof *et al.*, 2002; Charest und Bouvier, 2003; Ferguson *et al.*, 2002; Moffett *et al.*, 1996). Weiterhin wurde vorgeschlagen, daß die Palmitylierung von Proteinen für eine effiziente Verankerung von Proteinen in Lipid-Raft-Bereichen der Zellmembran notwendig ist (Bijlmakers und Marsh, 2003; Li *et al.*, 2003; Melkonian *et al.*, 1999).

Die Palmitylierung des US28-Rezeptors wurde durch den Einbau von [ $^3$ H]-Palmitinsäure in Zusammenarbeit mit Thilo Mokros bestimmt. Dazu wurden US28-transfizierte Zellen mit [ $^3$ H]-Palmitinsäure inkubiert, die Zellen wurden im Anschluß lysiert und der US28-Rezeptor mit dem Antikörper Tub-45 immunpräzipitiert. Im Vergleich zu CCR5 war der Einbau der Palmitinsäure bei US28 deutlich geringer (Abb. 4.19.A). Dies kann zum einen durch eine nicht vollständige Einwanderung des Rezeptors in das Acrylamidgel erklärt werden.

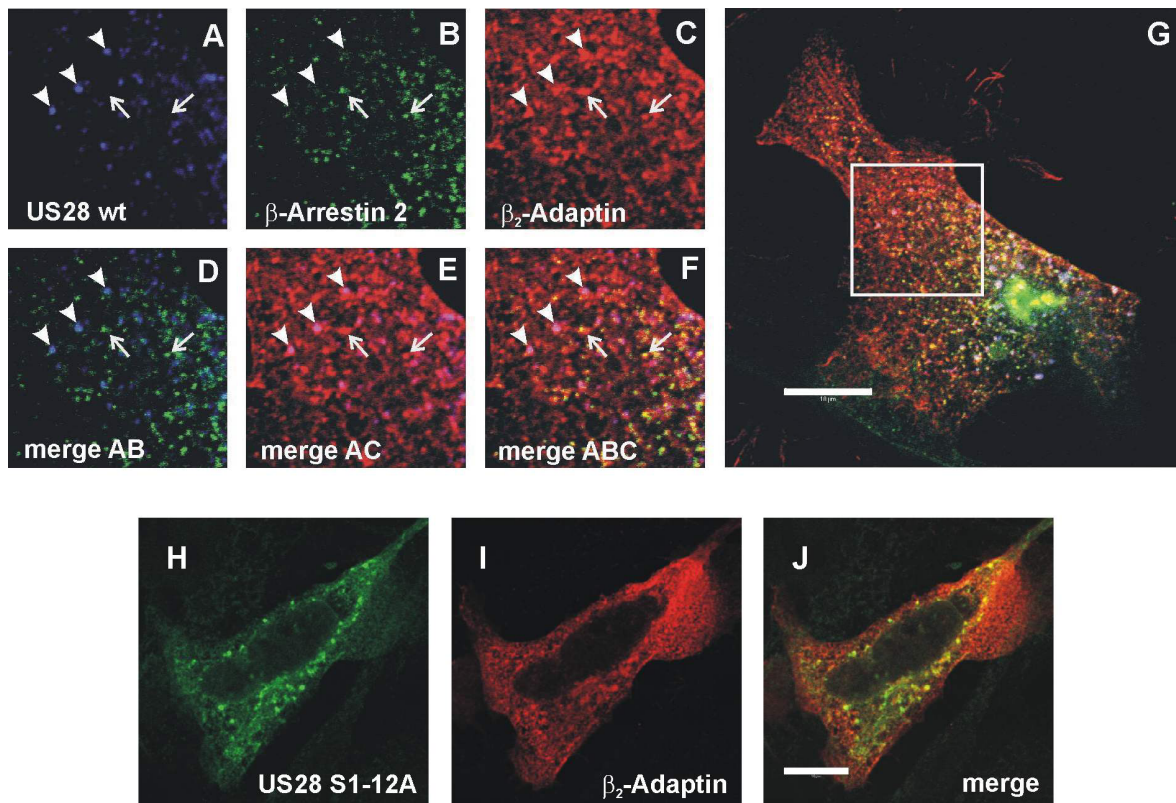


**Abb. 4.19. Der US28-Rezeptor ist palmityliert.** (A) HEK293A-Zellen wurden mit CCR5 oder US28 wt transfiziert und metabolisch mit [ $^3\text{H}$ ]-Palmitat markiert. Der US28-Rezeptor wurde aus den Solubilisaten markierter Zellen mit dem US28 Tub-45 und CCR5 mit mAk R22/7 immunpräzipitiert und in einer SDS-PAGE analysiert. Die Autoradiographie zeigt eines von zwei Experimenten mit gleichem Ergebnis. Die eingesetzten Rezeptormengen wurden in einer zweiten SDS-PAGE in einem Immunblot (IB) kontrolliert. (B, C) HEK293A-Zellen wurden mit US28 wt, US28 C304A, US28 C347A oder US28 C304,347A transfiziert und 48 h nach der Transfektion wurde die Endozytose (siehe Abb. 4.12.) des US28-Rezeptors als Aufnahme von [ $^{125}\text{I}$ ]-RANTES bestimmt. Jeder Meßpunkt ist der Mittelwert  $\pm$  S.D. aus drei unabhängigen Experimenten.

Weiterhin besitzt der US28-Rezeptor nur zwei potentielle Palmitylierungsstellen im C-Terminus, während bei CCR5 alle drei möglichen Palmitylierungsstellen verwirklicht sind (Blanpain *et al.*, 2001; Kraft *et al.*, 2001; Percherancier *et al.*, 2001).

Bei dem humanen Chemokinrezeptor CCR5 war die Palmitylierung Voraussetzung für eine effiziente Internalisierung (Kraft *et al.*, 2001). Um zu untersuchen, ob die Palmitylierung des US28-Rezeptors seine Internalisierung beeinflusst, wurden Rezeptorvarianten hergestellt, bei denen die potentiellen Palmitylierungsstellen am C-Terminus gegen Alaninreste ausgetauscht wurden (Cysteinreste an den Positionen 304 und 347 siehe Abb.1.6.). Die Internalisierung dieser Mutanten wurde durch die Aufnahme von [ $^{125}\text{I}$ ]-RANTES nach 0, 10 und 60 min gemessen. Die Internalisierungsraten dieser Mutanten sowie einer Doppelmutante, bei der beide





**Abb. 4.20. US28 wt und die phosphorylierungsdefiziente Mutante US28 S1-12A kolokalisieren mit dem AP-2-Komplex.** HEK293A-Zellen wurden kotransfiziert mit (A-G) US28 wt,  $\beta$ -Arrestin-2-GFP und  $\beta_2$ -Adaptin-FLAG oder (H-J) US28 S1-12A und  $\beta_2$ -Adaptin-FLAG. 36 h nach der Transfektion wurden  $\beta_2$ -Adaptin-FLAG und der US28-Rezeptor mit dem FLAG-spezifischen Antikörper M2 und US28 mit dem Biotin-markierten Antikörper Tub-06 angefärbt und in der konfokalen Mikroskopie analysiert. Der Maßstab entspricht 10  $\mu$ m.

Cysteinreste durch Alaninreste ersetzt wurden, unterschieden sich jedoch nicht signifikant von der Internalisierungsrate des wt-Rezeptors (Abb. 4.19 B,C). Aufgrund dieser Beobachtungen kann vermutet werden, daß die Palmitoylierung C-terminaler Cysteinreste nicht relevant für die Internalisierung des US28-Rezeptors ist.

#### 4.2.14. US28 kolokalisiert mit dem AP-2-Komplex

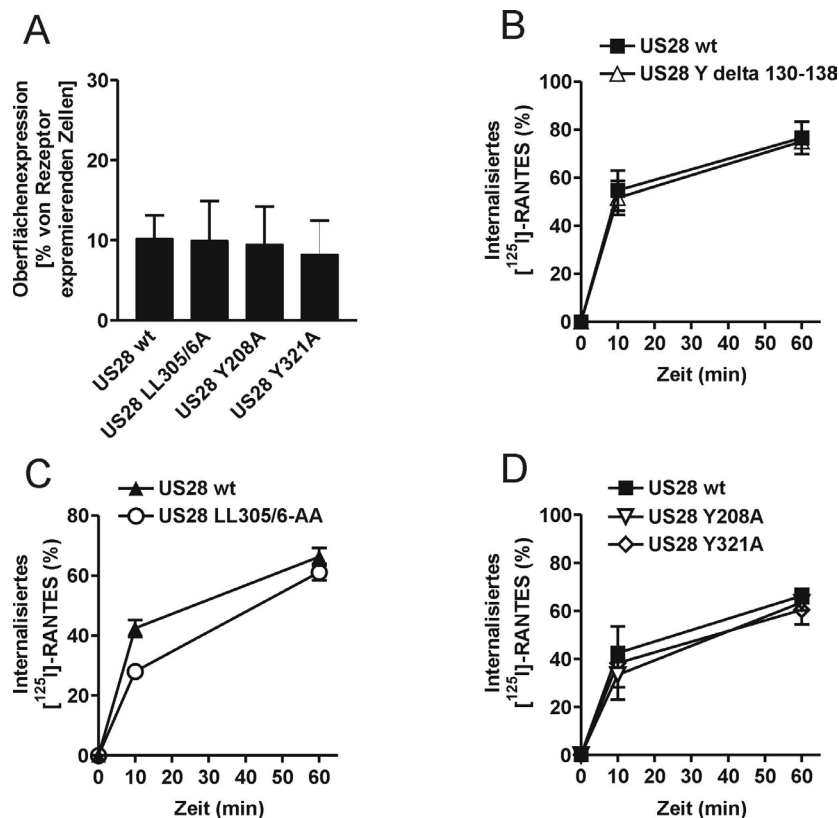
Die Internalisierung des US28-Rezeptors und der phosphorylierungsdefizienten Mutante US28 STA wurde durch die Inkubation mit Saccharose partiell gehemmt. Dies läßt eine Internalisierung auf dem Clathrin-Weg vermuten. Da die Internalisierung des US28-Rezeptors unabhängig von  $\beta$ -Arrestin-Molekülen erfolgte, sollte untersucht werden, ob ein weiteres Schlüssel-molekül des Clathrin-Weges, der AP-2-Komplex, an der Internalisierung des US28-Rezeptors beteiligt ist. Der heterotetramere AP-2-Komplex besteht aus zwei großen Untereinheiten von 100 kDa ( $\alpha$ -,  $\beta_2$ -Adaptin), einer mittleren Untereinheit von 50 kDa ( $\mu_2$ -Adaptin)

und einer kleinen Untereinheit von 17 kDa ( $\sigma_2$ -Adaptin) (Brodsky *et al.*, 2001). Funktionell verbindet AP-2 den Rezeptor-Arrestin-Komplex oder aber den Rezeptor direkt mit Clathrin-Molekülen (Laporte *et al.*, 2000). Um zu untersuchen, ob der AP-2-Komplex an der Internalisierung von US28 beteiligt ist, wurde zunächst das gemeinsame Vorkommen des US28-Rezeptors sowie der phosphorylierungsdefizienten Mutante US28 S1-12A und des AP-2-Komplexes in der Zelle untersucht. Dazu wurden HEK293A-Zellen mit US28 wt,  $\beta$ -Arrestin-2-GFP und  $\beta_2$ -Adaptin-FLAG, oder US28 S1-12A und  $\beta_2$ -Adaptin-FLAG kotransfiziert. 36 h nach der Transfektion wurden US28 und  $\beta_2$ -Adaptin-FLAG durch spezifische Antikörper in fixierten und permeabilisierten Zellen nachgewiesen. In der konfokalen Mikroskopie konnte eine Kolokalisation (pink, Pfeilspitzen E,F) von  $\beta_2$ -Adaptin-FLAG (rot C) mit dem US28 wt – Rezeptor (blau A) beobachtet werden. Ebenso konnte eine Kolokalisation (gelb J) der phosphorylierungsdefizienten Mutante US28 S1-12A (grün H) mit dem  $\beta_2$ -Adaptin-FLAG-Molekülen (rot I) nachgewiesen werden.

Die gezeigte Kolokalisation (gelb, Pfeile F) von Arrestin-2-GFP (grün B) und  $\beta_2$ -Adaptin-FLAG (rot C) bestätigt zusätzlich, daß Arrestin in Vesikeln des Clathrin-abhängigen Endozytoseweges vorlag, obwohl es offenkundig nicht mit dem US28-Rezeptor kolokalisierte (D Pfeilspitzen).

#### 4.2.15. Das Dileuzinmotiv reguliert eine schnelle Internalisierung des US28-Rezeptors

Den einzelnen Untereinheiten des AP-2-Komplexes werden verschiedene Aufgaben bei der Internalisierung von GPCRs zugeschrieben. Dabei erfolgt die Bindung des AP-2-Komplexes an Clathrin über die  $\beta_2$ -Adaptin-Untereinheit (Shih *et al.*, 1995), während die Bindung der Frachtmoleküle über die  $\mu_2$ -Untereinheit erfolgt. Die Voraussetzung dafür bilden auf der Seite der Frachtmoleküle/Rezeptoren sogenannte Tyrosin-enthaltende Motive (z.B. Yxx $\Phi$  bei dem x für eine beliebige Aminosäure steht, während  $\Phi$  vorwiegend für hydrophobe Aminosäuren steht) (Ohno *et al.*, 1995; Owen und Evans, 1998). Andere Motive, wie Dileuzin-Motive, können ebenfalls mit dem AP-2-Komplex in Wechselwirkung treten (Haucke und Krauss, 2002; Heilker *et al.*, 1996). Dabei ist eine genaue Lokalisation der Bindungsstelle des AP-2-Komplexes nicht bekannt. Mit Hilfe einer Mutagenesestudie sollte geprüft werden, welche der in der Sequenz des US28-Rezeptors gefundenen Motive an einer Internalisierung beteiligt



**Abb. 4.21. Das Dileuzin-Motiv des US28-Rezeptors ist für seine schnelle Endozytose notwendig.** (A) HEK293A-Zellen wurden mit US28 wt, US28 Y208A, US28 Y321A und US28 LL305/306AA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde die Rezeptorexpression an der Oberfläche von intakten Zellen und die Gesamtexpression an fixierten und permeabilisierten Zellen durchflußzytometrisch bestimmt. Es ist angegeben, bei wievielen der Rezeptor-exprimierenden Zellen eine Lokalisation an der Zelloberfläche nachgewiesen wurde. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte  $\pm$  S.D. von fünf unabhängigen Experimenten. (B-D) HEK293A-Zellen wurden mit US28 wt, US28 Delta 130-138, US28 Y208A, US28 Y321A und US28 LL305/306AA wie angegeben transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde die Endozytose des US28-Rezeptors in einem Internalisierungsexperiment (siehe Abb. 4.12) als Aufnahme von [ $^{125}$ I]-RANTES bestimmt. Jeder Meßpunkt ist der Mittelwert  $\pm$  S.D. aus drei unabhängigen Experimenten.

sind. Dazu wurden die sich im Sequenzmotiv befindlichen Tyrosinreste an den Positionen Y208 (dritte intrazelluläre Schleife), Y321 (C-Terminus), sowie die beiden Leuzinreste an Position LL305/306 (C-Terminus) gegen Alaninreste ausgetauscht. Die Mutagenese der 2. intrazellulären Schleife an den Positionen Y130, 131 und 138 ergab eine Mutante (US28 Delta 130-138), bei der der Tyrosinrest der Position 130 durch einen Prolinrest ersetzt war, das Tyrosin an Position 131 fehlte, während der Tyrosinrest an Position 138 durch einen Alaninrest ersetzt war. Die durchflußzytometrische Untersuchung ergab, daß sich alle Mutanten nicht signifikant in Bezug auf ihre Oberflächenexpression vom US28 wt-Rezeptor unterschieden.

den (Abb. 4.21.A). Um zu untersuchen, ob die Tyrosin-Motive bzw. das Dileuzin-Motiv an der Internalisierung des US28-Rezeptors beteiligt sind, wurden HEK293A-Zellen mit dem US28 wt-Rezeptor oder den Mutanten transfiziert und die Endozytoserate wurde durch die Aufnahme von [ $^{125}$ I]-RANTES bestimmt. Dabei unterschied sich die Internalisierungsrate der Tyrosin-Mutanten nicht von US28-wt-transfizierten Zellen (Abb. 4.21. B,D). Der Austausch der Leuzinreste an den Positionen 305/306 führte jedoch zu einer Hemmung der Internalisierung um 37 % nach 10 min im Vergleich zum US28 wt-Rezeptor (Abb.4.21.C). Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Tyrosin-basierenden Sequenzmotive der 3. intrazellulären Schleife und des C-Terminus die Internalisierung des US28-Rezeptors nicht beeinflussen, während die Leuzinreste hingegen die schnelle Internalisierung des Rezeptors regulierten.



## 5. Diskussion

Im Verlauf dieser Arbeit wurde gezeigt, daß (1) die durch US11-vermittelte Verminderung der MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche von DCs nicht ausreichend war, um eine Proliferation peptidspezifischer T-Zellen zu hemmen. (2) Der US28-Rezeptor wurde sowohl auf Clathrin- als auch auf Lipid-Raft-abhängigen Wegen endozytiert. (3) Als strukturelle Voraussetzungen für die Internalisierung des US28-Rezeptors konnten die C-terminalen Phosphorylierungsstellen und ein C-terminales Dileuzinmotiv identifiziert werden. (4) Weiterhin konnte beobachtet werden, daß das DRY-Motiv am Übergang der dritten Transmembran-Domäne die Aktivierung sowohl von konstitutiven als auch Liganden-vermittelten Signalwegen reguliert.

### 5.1. Bedeutung des US11-Proteins bei Aktivierung von CTLs

Ein zentraler Teil des Immunsystems bei der Abwehr von HCMV-Infektionen wird von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen repräsentiert. Zu dieser Ansicht trugen Untersuchungen an Patienten mit einer eingeschränkten CD8-spezifischen T-Zellantwort bei, da diese Patienten ein erhöhtes Risiko für eine Reaktivierung des HCMV aufwiesen (Quinnan *et al.*, 1982; Reusser *et al.*, 1991). Dennoch scheint die schützende Rolle der CD8<sup>+</sup> T-Zellen während einer HCMV-Infektion überraschend, da das Virus-Genom für vier Gene kodiert (US2, US3, US6, US11), die eine Präsentation viraler Antigene in infizierten Zellen *in vitro* stark vermindern und somit dem Erkennen virusinfizierter Zellen entgegenstehen (Jones *et al.*, 1995). US3 wird schnell, aber transient nach der Infektion exprimiert und hält MHC-Klasse-I-Moleküle im ER zurück (Jones *et al.*, 1996). Die Proteine US2 und US11 werden während der frühen Phase der Infektion exprimiert. Sie bewirken den retrograden Transport neu synthetisierter MHC-Klasse-I-Moleküle in das Zytoplasma, wo diese proteasomal abgebaut werden (Jones und Sun, 1997; Wiertz *et al.*, 1996). US6 wird während der späten Phase der Infektion exprimiert und blockiert den TAP-Transporter, der für den Transport der MHC-Klasse-I-stabilisierenden Peptide vom Zytoplasma in das ER-Lumen verantwortlich ist (Ahn *et al.*, 1997; Lehner *et al.*, 1997). Da in dieser Arbeit das US11-Protein des humanen Zytomegalievirus untersucht werden sollte, wurde zunächst getestet, ob das Protein ebenfalls die Expression von Maus-MHC-Klasse-I-Molekülen beeinflusst. Ein solches heterologes Expressionssystem für HCMV-kodierte Antigene wäre von Nutzen, um ein Tiermodell etablieren zu können, in dem die aus *in vitro*-Untersuchungen bekannten immunmodulatorischen Eigenschaften *in vivo* überprüfbar wären.

Dazu wurde die Maus-Zelllinie MCA-205 verwendet, die MHC-Klasse-I-Moleküle der Allele H2-D<sup>b</sup> und H2-K<sup>b</sup> exprimiert. Die adenovirale Expression des US11-Proteins bewirkte in MCA-205 Zellen einen nahezu vollständigen Verlust der getesteten MHC-Klasse-I-Moleküle H2-D<sup>b</sup> und H2-K<sup>b</sup>. Daher sollte überprüft werden, inwieweit US11 ebenfalls die Expression der MHC-Moleküle in primären DCs beeinflusst. Dendritische Zellen sind deshalb von besonderem Interesse, da sowohl reife als auch unreife DCs durch HCMV-infiziert werden können (Jahn *et al.*, 1999; Raftery *et al.*, 2001; Riegler *et al.*, 2000; Senechal *et al.*, 2004). Funktionell stehen DCs im Zentrum einer adaptiven Immunantwort, da sie eine der effizientesten antigen-präsentierenden Zellpopulationen darstellen. Der adenovirale Transfer des US11-Gens in DCs bewirkte im Gegensatz zu den MCA-205-Zellen eine unterschiedlich starke Beeinflussung der getesteten MHC-Allele. Dabei wurde die Expression der H2-D<sup>b</sup>-Moleküle an der Zelloberfläche stärker vermindert als die der H2-K<sup>b</sup>-Moleküle. Dieses Phänomen konnte auch in anderen Maus-Zellsystemen beobachtet werden (Basta *et al.*, 2002; Machold *et al.*, 1997).

Obwohl die Expression von US11 zu einer bis zu 60%-igen Verminderung der H2-D<sup>b</sup>-Expression führte, wurde hierdurch die antigenspezifische T-Zellproliferation nicht beeinträchtigt. Eine mögliche Erklärung hierfür bieten frühere Untersuchungen, in denen die Aktivierungsschwelle von T-Zellen analysiert wurde. Dabei waren bereits weniger als 210 MHC-Moleküle ausreichend, um eine Aktivierung von T-Zellen zu bewirken (Harding und Unanue, 1990). In einer Studie von Sykulev *et al.* wurde berichtet, daß bereits ein MHC-Klasse-I-Molekül auf einer Zielzelle ausreichend war, eine T-Zell-vermittelte Lyse auszulösen (Sykulev *et al.*, 1996).

Weiterhin konnten in *in vitro* Studien an HCMV-infizierten humanen DCs ebenfalls nur eine partielle Hemmung der MHC-Klasse-I-Expression gezeigt werden. Dabei führte die Infektion reifer DCs mit HCMV zu einer verstärkten Expression der Apoptose-vermittelnden Liganden CD95L und TRAIL, wodurch ein neuartiger Mechanismus einer HCMV-vermittelten T-Zellhemmung durch infizierte DCs angedeutet wird (Raftery *et al.*, 2001). In einer kürzlich veröffentlichten Studie an HCMV-infizierten DCs konnte eine weitere Strategie des HCMV gezeigt werden, dem Immunsystem zu entgehen. Dabei führte die Infektion reifer DCs zu einer Abgabe von löslichem CD83, wodurch die Aktivität uninfizierter benachbarter DCs und damit eine T-Zell-Proliferation durch einen nicht genauer bekannten Weg blockiert wurde (Senechal *et al.*, 2004).

Aufgrund der hier vorgestellten Beobachtungen und der Ergebnisse von Raftery *et al.* und Senechal *et al.* kann angenommen werden, daß allein die partielle Verminderung der MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche dendritischer Zellen nicht ausreichend ist, um eine Ak-

tivierung von T-Zellen zu verhindern. Demgegenüber zeigt eine Studie von Berger *et al.* an humanen Fibroblasten, daß die Expression von US11 ausreichte, um eine Lyse dieser Zellen durch zytotoxische T-Lymphozyten zumindest teilweise zu hemmen. Eine komplette Inhibition der CTL-vermittelten Lyse wurde aber erst nach Koexpression eines weiteren viralen Genproduktes, dem ICP47 des Herpes Simplex-Virus 1, erreicht (Berger *et al.*, 2000). Die Tatsache, daß die verschiedenen Studien zwei unterschiedliche Mechanismen (T-Zellaktivierung vs. Zellyse) betrachten, mag die unterschiedlichen Ergebnisse erklären. Zudem wurde die Untersuchung in unterschiedlichen Zellsystemen durchgeführt, was darauf hindeutet, daß möglicherweise zelltypspezifische Unterschiede die Verminderung der MHC-Klasse-I-Moleküle durch US11 beeinflussen können.

Kürzlich wurde in zwei Studien die *in vivo* Funktion des US11-Proteins untersucht. Die Studie von Shen *et al.* zeigte, daß durch die Expression des US11-Proteins zwar nicht die Oberflächenexpression der MHC-Moleküle beeinflußt wird, US11 dennoch die Expression neu synthetisierter Antigene signifikant verringert. Dadurch wurde effektiv eine Induktion einer antiviralen Immunantwort oder aber das Erkennen infizierter Zellen vermindert (Shen *et al.*, 2002). Die zweite Studie von Basta *et al.* zeigt, daß die Expression von US2 oder US11 zu einer signifikant verringerten Anzahl von Antigen-spezifischen T-Zellen führt (Basta *et al.*, 2002). Eine komplette Hemmung der T-Zellantwort wurde aber in beiden Studien nicht erreicht. Im Gegensatz zu den erwähnten Studien wurde in dieser Arbeit das Antigen als Peptid von außen den Zellen zugegeben. Interessanterweise kann die Präsentation der exogenen Antigene auf MHC-Klasse-I-Molekülen auch durch eine direkte Bindung der Peptide an MHC-Klasse-I-Moleküle an der Zelloberfläche erfolgen (Su *et al.*, 1998; Su *et al.*, 1999). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Aktivierung der in der Arbeit verwendeten gp-33-spezifischen T-Zellen auch über eine Stimulation exogen gebundener Peptide erfolgte.

Zusammenfassend beschreiben die hier vorgelegten Daten, daß die alleinige Expression von US11 in dendritischen Zellen nicht ausreichend war, die Aktivierung (Proliferation) von zytotoxischen T-Zellen zu hemmen. Als Ursache dafür kann eine nur partielle Verminderung der MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche angenommen werden. Dennoch wird zumindest in HCMV-infizierten dendritischen Zellen eine Aktivierung von T-Zellen verhindert (Raftery *et al.*, 2001; Senechal *et al.*, 2004). Somit scheint die partielle Verminderung der MHC-Klasse-I-Moleküle in infizierten DCs durch weitere immunmodulatorische Mechanismen des HCMV (FasL und TRAIL oder CD83) komplementiert zu werden.

Zum Nachteil des Virus würde ein kompletter Verlust aller MHC-Klasse-I-Moleküle einen zweiten Weg der antiviralen Immunantwort aktivieren, der eine Lyse dieser Zelle durch NK-



Zellen vermittelt. Die Aktivität der NK-Zellen wird durch die Bindung an MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche möglicher Zielzellen verhindert (Karre, 1997; Lanier *et al.*, 1997).

Die Expression des HIV-kodierten Proteins Nef führt zu einer verminderten Expression von HLA-A und HLA-B Molekülen auf der Oberfläche und interagiert so mit einer Erkennung durch CTLs. Eine Expression von HLA-C und HLA-E Molekülen, die durch verschiedene NK-Zellrezeptoren erkannt werden, wird aber nicht beeinflusst (Cohen *et al.*, 1999; Collins *et al.*, 1998). Auch die HCMV-kodierten Proteine US2 und US11 interagieren im humanen System speziell mit HLA-A und HLA-B Molekülen, jedoch nicht mit Produkten des HLA-C- (HLA-Cw4) und HLA-G-Locus (Schust *et al.*, 1998). Somit kann vermutet werden, daß die US11-vermittelte Modulation der MHC-Klasse-I-Expression nicht zu einer Aktivierung von NK-Zellen führt. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen konnte eine US11-vermittelte Degradation von HLA-C Molekülen in HeLa-Zellen beobachtet werden, die zu einer spezifischen Lyse US11-transfizierter Zellen durch NK-Zellen führte (Huard und Fruh, 2000).

Zusammenfassend kann das US11-Molekül als Teil eines umfassenden Systems zur Hemmung spezifischer zytotoxischer T-Zell-Antworten angesehen werden, dessen Funktionsweise im Wechselspiel mit der menschlichen Immunantwort noch weitgehend unverstanden ist.

## 5.2. Die Internalisierung des US28-Rezeptors

Im Allgemeinen weisen GPCRs eine hohe Expression an der Zelloberfläche auf. Im Gegensatz dazu konnte nur eine geringe Expression des US28-Rezeptors an der Zelloberfläche transfizierter HEK293A-Zellen nachgewiesen werden. Mit Hilfe mikroskopischer Untersuchungen konnte eine Anreicherung des US28-Rezeptors in intrazellulären Kompartimenten gezeigt werden, während der humane RANTES-Rezeptor CCR5 im inaktiven Zustand eine Verteilung an der Plasmamembran aufwies. Als Ursache für das vorwiegend endosomale Vorkommen des US28-Rezeptors kann die konstitutive Endozytose des Rezeptors angesehen werden (Fraile-Ramos *et al.*, 2001), die durch eine konstitutive Phosphorylierung reguliert wird (Mokros *et al.*, 2002). Nach einem allgemeinen Modell werden aktivierte GPCRs zunächst durch Mitglieder der GRKs an intrazellulären Domänen phosphoryliert, wodurch die Bindung von Arrestin-Molekülen an den Rezeptor erleichtert wird (vgl. Abb.1.5.). Diese Bindung von Arrestin-Molekülen an den Rezeptor führt zu einer Hemmung des Rezeptors, die eine erneute Interaktion mit seinen spezifischen G-Proteinen und somit eine erneute Stimulation verhindert (Desensitivierung). Über die Bindung von Rezeptor und Arrestin-Molekül

wird im Folgenden die Internalisierung des Rezeptors in Clathrin-umhüllten Vesikeln vermittelt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte eine von  $\beta$ -Arrestin-Molekülen unabhängige Internalisierung des US28-Rezeptors gezeigt werden, da die eingesetzten dominant negativen Arrestin-Mutanten V53D und Arrestin 319-418 die Internalisierung des US28-Rezeptors nicht beeinflussten. Weiterhin konnte bei der Internalisierung der US28 R129A-Mutante, die keine konstitutive Umlagerung von Arrestin-Molekülen in vesikuläre Strukturen vermittelt, kein signifikanter Unterschied verglichen mit dem wt-Rezeptor beobachtet werden. Eine von  $\beta$ -Arrestin-Molekülen unabhängige Internalisierung ist in HEK293A-Zellen ebenfalls für den humanen Chemokinrezeptor CXCR2 beschrieben worden (Mueller *et al.*, 1997). Überraschenderweise wurden in einem anderen Expressionssystem, in 3AsubE-Zellen, jedoch Hinweise auf eine  $\beta$ -Arrestin-abhängige Internalisierung von CXCR2 gefunden (Fan *et al.*, 2001). Die  $\beta$ -Arrestin-Unabhängigkeit der US28-Internalisierung wird ebenfalls durch Experimente in Arrestin-defizienten Fibroblasten unterstützt, die aus  $\beta$ -Arrestin-1 und -2 deletierten Mausembryonen stammten (Fraile-Ramos *et al.*, 2003). Somit scheint die Arrestin-unabhängige Internalisierung des US28-Rezeptors aufgrund der gleichen Beobachtungen in verschiedenen Spezies- und Zellsystemen ein generelles intrinsisches Merkmal des Rezeptors zu sein. Allgemein wurde die ursprüngliche Annahme einer generellen Arrestin-Abhängigkeit der GPCR-Endozytose durch zahlreiche Beobachtungen mittlerweile in Frage gestellt (Abb. 5.1.). So wurde eine von Arrestin-Molekülen unabhängige Internalisierung ebenso für den N-Formylpeptid-Rezeptor, den 5HT<sub>2A</sub>-Rezeptor und die muskarinergen m1-, -m3- und -m4-Rezeptoren beschrieben (Bhatnagar *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1998; Pals-Rylaarsdam *et al.*, 1997; Vines *et al.*, 2003).

Neben Arrestin-Molekülen sind verschiedene andere Moleküle an der Clathrin-abhängigen Internalisierung von GPCRs beteiligt. Zu diesen gehören der Adapterkomplex 2 (AP-2) und die GTP-ase Dynamin. AP-2 vermittelt über eine Bindung an  $\beta$ -Arrestin- und Clathrin-Moleküle die Einbindung des aktivierten GPCRs in CCVs. Bei einigen Rezeptoren, wie dem humanen Chemokinrezeptor CXCR2, kann diese Einbindung auch unabhängig von  $\beta$ -Arrestin über eine direkte Interaktion des Rezeptors mit dem AP-2-Komplex stattfinden (Fan *et al.*, 2001).

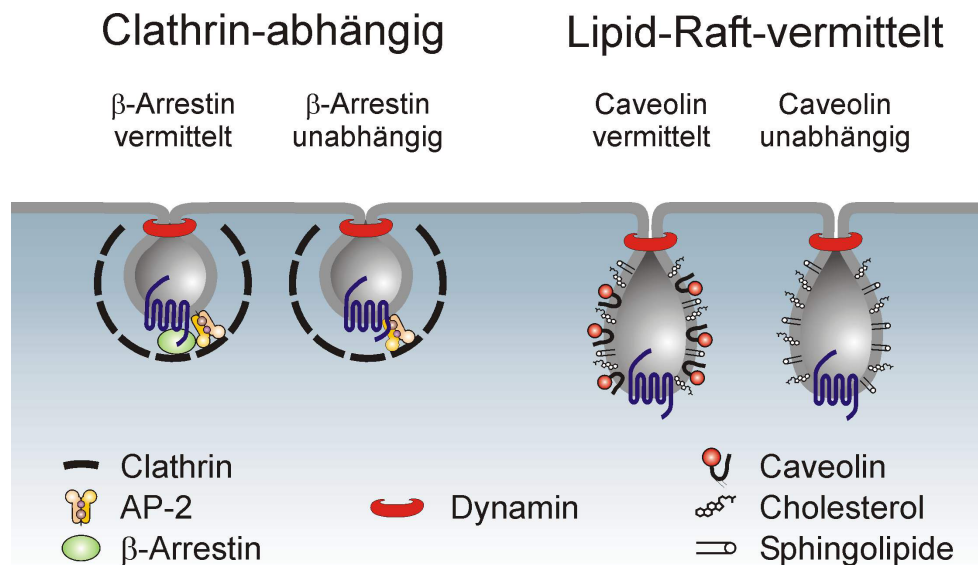
Somit deutet die hier nachgewiesene Kolokalisation von US28 mit dem AP-2-Komplex an, daß US28 trotz der Unabhängigkeit von  $\beta$ -Arrestin über den Clathrin-Weg internalisiert wird. Diese Annahme wird durch elektronenmikroskopische Untersuchungen an US28-GFP Fusionsproteinen unterstützt, die eine Lokalisation des US28-Rezeptors in CCV zeigten (Fraile-

Ramos *et al.*, 2001). Eine weitere Komponente dieses Internalisierungsweges ist die GTP-ase Dynamin, die Clathrin-umhüllte Membranbereiche von der Plasmamembran abschnürt und damit eine Internalisierung des Rezeptors in CCVs erlaubt.

Die Koexpression der Mutante mit GTP-ase-defizienter Aktivität, Dynamin K44A, bewirkte eine verminderte Internalisierung und die Anreicherung des US28-Rezeptors an der Zelloberfläche. Die nur partielle Hemmung der US28-Internalisierung nach Kotransfektion der dominant-negativen Dynamin-Mutante kann möglicherweise auf folgende Ursachen zurückgeführt werden: (1) Es gibt noch andere Dynamin-unabhängige Wege der Internalisierung des US28-Rezeptors. (2) Durch die Kotransfektion wurden nicht alle US28-transfizierten Zellen auch mit Dynamin K44A transfiziert, wodurch in einigen Zellen die Internalisierung des US28-Rezeptors nicht gehemmt werden konnte. (3) Die transfizierte Menge des Dynamin K44A war nicht ausreichend, um endogen exprimiertes Dynamin vollständig zu hemmen.

Dynamin ist neben der Abschnürung von CCV auch an der Abschnürung von Caveolae beteiligt (Ferguson, 2001; Henley *et al.*, 1998). Zu den biologischen Aufgaben der Caveolae gehört zum einen die Organisation funktioneller Membranbereiche, in denen bestimmte Signalmoleküle zusammengeführt werden. Zu diesen zählen heterotrimere G-Proteine, Src Tyrosinkinasen und H-ras (Chun *et al.*, 1994; Parton, 2003; Rehm und Ploegh, 1997). Eine zweite Funktion ist die Internalisierung und damit auch die Desensitivierung von GPCRs wie sie für CCR5, den B2-Bradykinin-Rezeptor, den ET<sub>A</sub>-Endothelinrezeptor und den Cholezystokininrezeptor beschrieben wurden (Chun *et al.*, 1994; Lamb *et al.*, 2002; Mueller *et al.*, 2002; Roettger *et al.*, 1995).

Caveolae und Lipid-Rafts sind durch eine Anreicherung von Cholesterin, Glykolipiden und Sphingophospholipiden charakterisiert (Abb.5.1.). Caveolae stellen spezielle Bereiche der Lipid-Rafts dar, die sich durch die Gegenwart des Proteins Caveolin auszeichnen. Caveolin selbst scheint für die strukturelle Integrität der Caveolae verantwortlich zu sein (Harder und Simons, 1997). Um eine Beteiligung von Caveolae an der US28-Internalisierung zu untersuchen, wurden pharmakologische Inhibitoren benutzt, die mit dem Cholesterin in der Membran in Wechselwirkung treten. MCD (10 mM) entfernt Cholesterin aus der Plasmamembran und beeinflusst dadurch nicht nur den Caveolae-, sondern auch den Clathrin-Weg (Rodal *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu bindet Filipin III an das Cholesterin in der Plasmamembran und beeinflusst dadurch spezifisch die Internalisierung über den Caveolae/Lipid-Raft-Weg. Die hier gezeigte Verminderung der US28-Rezeptor-Internalisierung in Gegenwart von Filipin lieferte einen ersten Hinweis darauf, daß US28 zusätzlich zum CCV-Weg auch über Caveolae



**Abb. 5.1. Internalisierungswege von GPCRs.** Der am besten untersuchte Weg der Internalisierung von GPCRs erfolgt abhängig von Arrestin-Molekülen über CCV. Neben diesem Hauptweg wurde bei einigen GPCRs auch eine Arrestin-unabhängige Internalisierung über CCV beschrieben. Weiterhin ist eine Endozytose von GPCRs über Lipid-Raft-abhängige Wege bekannt. Sie können entweder über Caveolae oder unabhängig von Caveolin erfolgen. Die Abschnürung der CCV und Lipid-Rafts wird durch die GTP-ase Dynamin vermittelt.

oder Lipid-Rafts internalisiert wird. Im Gegensatz dazu wird die Internalisierung des US28-Rezeptors nach Inkubation der Zellen mit 5 mM MCD nur zu frühen Zeitpunkten beeinflusst. Lipid-Rafts/Caveolae sind aufgrund des hohen Anteils an Cholesterin und Sphingophospholipiden unlöslich in TX-100-haltigem Lysepuffer. In Übereinstimmung damit wurde ein Teil der US28-Rezeptor-Moleküle, nicht aber die als Kontrolle verwendeten MHC-Klasse-I-Moleküle, in der TX-100-unlöslichen Fraktion gefunden. Weiterhin führte die subzelluläre Fraktionierung US28-transfizierter Zellen über einen Saccharosegradienten zu einer Kofraktionierung des US28-Rezeptors und Caveolin 1, wenn der US28-Rezeptor in hohen Expressionsraten vorlag (persönliche Mitteilung A. Rehm). In diesem Zusammenhang ist die während der Doktorarbeit gezeigte US28-Palmylierung von Interesse. Allgemein stellt die Palmylierung von Cysteinresten eine strukturelle Voraussetzung für eine Assoziation verschiedener Proteine, wie Mitglieder der Src-Familie sowie einigen  $G\alpha$ -Untereinheiten, mit Lipid-Rafts/Caveolae dar (Resh, 1999). Die Verhinderung der Palmylierung bewirkt ein vermindertes Vorkommen dieser Proteine in Lipid-Rafts oder Caveolae (Li *et al.*, 1996; Waheed und Jones, 2002).

Das Fehlen einer Kolo-kalisation des US28-Rezeptors mit Caveolin 1 in der konfokalen Mikroskopie schließt eine Lipid-Raft-abhängige Internalisierung nicht aus, wenngleich damit eine Caveolae-abhängige Internalisierung des US28-Rezeptors unwahrscheinlich ist. In Übereinstimmung mit den hier dargelegten Beobachtungen für US28 wurde kürzlich eine Lipid-Raft-abhängige, aber Caveolin-unabhängige Internalisierung von CD36 beschrieben (Zeng *et al.*, 2003). Ebenso zeigten Studien in Caveolin-defizienten Mäusen, daß durch das Fehlen der Caveolin-Moleküle die Endozytose Lipid-Raft/Caveolae-internalisierender Moleküle nicht beeinflußt wird (Galbiati *et al.*, 2001).

Demgegenüber bewirkte der Einsatz von 0,4 M Saccharose, wodurch eine spezifische Hemmung des Clathrin-Wegs erreicht wird, eine starke Verminderung der US28-Internalisierung. Zusammenfassend kann gefolgert werden, daß der Hauptweg der Internalisierung des US28-Rezeptors Arrestin-unabhängig über Clathrin-umhüllte Vesikel erfolgt. Zusätzlich ist ein Caveolin-unabhängiger, Lipid-Raft-abhängiger Weg an der Internalisierung beteiligt.

### **5.2.1. Die Internalisierung des US28-Rezeptors wird nicht durch die Aktivierung von Signalwegen reguliert**

Viele Moleküle, die an der Signalleitung beteiligt sind, wie G-Proteine, Rho, Rab, ARF6 sowie auch die verschiedenen Phosphoinosit-Moleküle, könnten ebenfalls an der Regulation der GPCR-Internalisierung beteiligt sein, da sie an der Restrukturierung des Aktinskeletts oder an der Bildung Clathrin-umhüllter-Vesikel mitwirken (Cavalli *et al.*, 2001). Die Frage, ob eine Aktivierung intrazellulärer Signalwege die Internalisierung von GPCRs vermittelt oder die Internalisierung und die Signalleitung unabhängig voneinander reguliert werden, läßt sich gegenwärtig nicht eindeutig beantworten. Hinweise auf eine Unabhängigkeit von der Signalaktivierung und Endozytose liefern verschiedene Rezeptormutanten, die ihre G-Proteine nicht mehr aktivieren können, aber nach Stimulation durch ihren Liganden internalisiert werden. Andererseits sind signalleitungsdefiziente Mutanten beschrieben worden, die nicht mehr endozytiert werden (Übersichten in Chalmers und Behan, 2002). Ein neuartiger Mechanismus der Internalisierung von GPCRs ist kürzlich für  $G\alpha_q$ -koppelnde Rezeptoren beschrieben worden. Die Internalisierung von CXCR4 und dem Thromboxan- $A_{2\beta}$ -Rezeptor, zwei an  $G\alpha_q$ -koppelnde Rezeptoren, ereignete sich teilweise unabhängig von PLC, PKC, GRK und Arrestin-Molekülen, war aber von einer Aktivierung der  $G\alpha_q$ -Untereinheit abhängig (Rochdi und Parent, 2003).

Für den US28-Rezeptor konnte eine konstitutive Aktivierung der PLC sowie des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B nachgewiesen werden (Casarosa *et al.*, 2001; Waldhoer *et al.*, 2002). Diese Aktivierung wird durch die Interaktion des Rezeptors mit der  $G\alpha_q$ -Untereinheit vermittelt (Casarosa *et al.*, 2001). Um zu untersuchen, ob die konstitutive Internalisierung abhängig von einer konstitutiven Aktivierung von Signalwegen ist, wurde die Mutante US28 R129A entwickelt. Diese Rezeptorvariante ist nicht in der Lage, über die heterotrimeren G-Proteine Signalwege zu aktivieren. Im Internalisierungsexperiment konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen US28-Rezeptor und der R129A-Mutante festgestellt werden. Demnach kann für US28 ausgeschlossen werden, daß die Internalisierung über die Aktivierung intrazellulärer Signalwege vermittelt wird.

### 5.3. Strukturelle Voraussetzungen der US28-Rezeptorendozytose

#### 5.3.1. Die phosphorylierungsdefizienten Mutanten US28 S1-12A und US28 STA internalisieren über die gleichen Wege wie der wt-Rezeptor

Die Phosphorylierung von C-terminalen Phosphoakzeptorstellen spielt eine entscheidende Rolle bei der Internalisierung von GPCRs. So führte der Austausch C-terminaler Serinreste durch Alaninreste bei CCR5 zu einer Verringerung der Rezeptorinternalisierung, die sich aufgrund einer fehlenden Interaktion mit Arrestin-Molekülen erklären läßt (Kraft *et al.*, 2001; Hüttenrauch *et al.*, 2002). Ebenso wie bei CCR5 führte der Austausch der C-terminalen Serine in der Variante US28 STA zu einer verminderten Internalisierung dieser Mutante gegenüber dem wt-Rezeptor (Mokros *et al.*, 2002). Diese Verringerung kann aber nicht auf ein Fehlen der Interaktion mit Arrestin-Molekülen zurückgeführt werden, da der US28-Rezeptor unabhängig von Arrestin-Molekülen internalisiert (siehe vorheriger Abschnitt und Fraile-Ramos *et al.*, 2003). Deshalb wurden verschiedene Internalisierungswege für die phosphorylierungsdefizienten Mutanten US28 S1-12A oder US28 STA im Vergleich zum wt-Rezeptor untersucht. Da Internalisierungswege von phosphorylierungsdefizienten US28-Mutanten bisher nicht untersucht waren, sollte zunächst geprüft werden, welche Adaptermoleküle die Internalisierung beeinflussen. Die Kotransfektion der dominant-negativen Mutante für Dynamin führte bei der US28 S1-12A-Variante zu einer vergleichbaren relativen Hemmung der Internalisierung wie beim wt-Rezeptor. Daraus läßt sich folgern, daß die US28-Phosphorylierung keinen regulatorischen Einfluß auf die Funktion der Dynamin-Moleküle im

Verlauf der Rezeptorendozytose besitzt. Der Einsatz der pharmakologischen Inhibitoren Filipin und Saccharose führte ebenso zu einer verminderten Internalisierung der US28 STA-Mutante, was analog zum wt-Rezeptor auf eine Beteiligung von Lipid-Rafts neben der Dominanz des CCV-Weges schließen läßt. Diese Annahme wird durch die Kolo-kalisation der phosphorylierungsdefizienten Mutante US28 S1-12A mit dem AP-2-Komplex gestützt. Zusammenfassend kann geschlossen werden, daß die Internalisierung der phosphorylierungsdefizienten Mutanten US28 S1-12A oder US28 STA in gleichem Maße von den untersuchten Adaptermolekülen abhängig war wie die Internalisierung des wt-Rezeptors. Dies läßt vermuten, daß die US28-Mutanten S1-12A und US28 STA über die gleichen Wege internalisiert werden wie der wt-Rezeptor und die Funktion der Adaptermoleküle nicht durch die US28-Phosphorylierung reguliert wird.

### **5.3.2. Bedeutung der Palmitoylierung des US28-Rezeptors für die Rezeptorinternalisierung**

Die Palmitoylierung ist eine weit verbreitete posttranslationale Modifikation zytoplasmatischer und membranständiger Proteine. Sie ermöglicht u.a. die Verankerung zytosolischer Proteine an Membranen und beeinflußt weiterhin die Endozytose, das Recycling, die Proteinstabilität sowie Transportwege vom ER zur Plasmamembran verschiedener Proteine (siehe Übersichten in Bijlmakers und Marsh, 2003; Qanbar und Bouvier, 2003). Eine Palmitoylierung wurde für verschiedene GPCRs beschrieben, darunter der  $\beta_2$ -adrenerge-Rezeptor, der  $V_2$ -Vasopressinrezeptor und CCR5 (Kraft *et al.*, 2001; Percherancier *et al.*, 2001; Schülein *et al.*, 1996). In dieser Arbeit konnte ebenfalls eine Palmitoylierung des viralen Chemokinrezeptors US28 gezeigt werden.

Die Palmitoylierung von GPCRs erfolgt an intrazytoplasmatisch gelegenen Cysteinresten vorwiegend am C-Terminus des Rezeptors, kann aber auch wie im Falle des  $\mu$ -Opioidrezeptors sowie der  $V_1$ - und  $V_2$ -Vasopressinrezeptoren außerhalb dieses Bereiches stattfinden (Chen *et al.*, 1998; Hawtin *et al.*, 2001; Qanbar und Bouvier, 2003). Untersuchungen des Rhodopsin-Rezeptors konnten die Palmitoylierung eines C-terminalen Cysteinrestes nachweisen, der 14 AS von der Transmembrandomäne entfernt war. Aufgrund des Abstandes von der vorhergesagten Transmembrandomäne wurde durch die Autoren vorgeschlagen, daß die Palmitoylierung des Cysteinrestes die Ausbildung einer vierten intrazellulären Schleife bewirkt (Ovchinnikov Yu *et al.*, 1988). Diese Vermutung konnte durch die Röntgenstrukturanalyse des Rinder-Rhodopsins erhärtet werden (Palczewski *et al.*, 2000). Potentielle Palmitoylierungs-

stellen des US28-Rezeptors befinden sich im C-Terminus an Position 304, 10 AS von der vorhergesagten Transmembrandomäne entfernt, sowie an Position 347 und an Position 66 in der ersten intrazellulären Schleife.

Die Relevanz C-terminaler Palmitoylierungen für die Rezeptorphosphorylierung oder Internalisierung wurde beispielhaft an verschiedenen GPCRs untersucht. Der Austausch des Cysteinrestes an Position 341 durch einen Glutaminrest des  $\beta_2$ -adrenergen-Rezeptors führte zu einer Hyperphosphorylierung, die auch nach der Stimulation des Rezeptors mit seinem Liganden nicht weiter erhöht werden konnte (Moffett *et al.*, 1993). Im Gegensatz dazu zeigten Studien am Vasopressinrezeptor und an CCR5, daß der Austausch der C-terminalen Cysteinreste zu einer verringerten basalen und Liganden-vermittelten Phosphorylierung führte (Kraft *et al.*, 2001; Schülein *et al.*, 1996). Ferner zeigten palmitoylierungsdefiziente Mutanten des V<sub>2</sub>-Vasopressinrezeptors (Schülein *et al.*, 1996), des humanen Somatostatinrezeptors (Hukovic *et al.*, 1998), des Thyreotropin-Releasing-Hormon-Rezeptors (Groarke *et al.*, 2001) und von CCR5 (Kraft *et al.*, 2001) ebenfalls eine verringerte Internalisierung. Im Falle des Thyreotropin-Releasing-Hormon-Rezeptors wurde diese verringerte Internalisierung auf eine verminderte Assoziation mit  $\beta$ -Arrestin-Molekülen zurückgeführt (Groarke *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu führte der Austausch der potentiellen Palmitoylierungsstellen Cystein 304 des US28-Rezeptors (C304A) zu keiner veränderten Internalisierung des Rezeptors. Ebenso wurde die Internalisierungsrate nach Austausch des Cysteinrestes an Position 347 durch einen Alaninrest nicht beeinflußt.

Die Palmitoylierung einiger GPCRs stellt eine strukturelle Voraussetzung für ein fehlerfreies Erreichen der Plasmamembran dar. So zeigen die palmitoylierungsdefizienten Mutanten des Vasopressinrezeptors und von CCR5 eine verminderte Lokalisation der Rezeptoren an der Zellmembran (Kraft *et al.*, 2001; Blanpain *et al.*, 2001; Percherancier *et al.*, 2001; Schülein *et al.*, 1996). Die Oberflächenexpression des US28-Rezeptors wurde nach Austausch der potentiellen Palmitoylierungsstellen nicht beeinflußt (Daten werden nicht gezeigt). Unter Berücksichtigung der vorgelegten Daten kann geschlossen werden, daß die Palmitoylierung C-terminaler Cysteinreste keine notwendige strukturelle Voraussetzung der US28-Endozytose darstellt.



### 5.3.3. Ein C-terminales Dileuzin-Motiv reguliert die Kinetik der US28-Internalisierung

In dieser Arbeit konnte die Kollokalisierung des AP-2-Komplexes und des US28-Rezeptors beschrieben werden. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung wurde kürzlich vorgeschlagen, daß die Internalisierung des US28-Rezeptors von AP-2 abhängig ist (Fraile-Ramos *et al.*, 2003). Für eine direkte Interaktion mit dem AP-2-Komplex sind sogenannte Tyrosin- und Dileuzinmotive auf Seite der Rezeptoren beschrieben. Tyrosin-basierende Motive bestehen entweder aus NPxY- oder Yxx $\phi$ -Sequenzmotiven (wobei x für beliebige Aminosäure- und  $\phi$  für hydrophobe Aminosäurenreste steht). Das Yxx $\phi$ -Motiv vermittelt die Bindung an die  $\mu_2$ -Untereinheit des AP-2-Komplexes (Owen und Evans, 1998).

Der US28-Rezeptor weist kein NPxY-Sequenzmotiv auf. Im Gegensatz dazu konnten auf zytoplasmatischer Seite vier Yxx $\phi$ -Konsensusmotive (Abb.1.6.) gefunden werden. Der Austausch der Tyrosine in den Konsensusmotiven führte zu keiner verminderten Internalisierung des US28-Rezeptors, so daß diese Motive nicht für eine direkte Interaktion mit dem AP-2-Komplex verantwortlich sein können. Neben Tyrosin-basierenden Motiven kann eine Bindung des Rezeptors auch über Dileuzin-Sequenzmotive an den AP-2-Komplex erfolgen. Eine exakte Lokalisation dieser Bindungsstelle innerhalb des AP-2-Komplexes ist bisher jedoch nicht bekannt. Allerdings scheint der Abstand der C-terminalen Dileuzinmotive von der Transmembranregion bedeutend für ihre Funktion zu sein. Dieser beträgt im Fall des US28-Rezeptors 10 AS von der vorausgesagten Transmembrandomäne und erfüllt somit einen Mindestabstand von 6-7 AS, um als Endozytosemotiv zu wirken (Geisler *et al.*, 1998).

Die funktionelle Relevanz des Dileuzinmotivs für die Rezeptorinternalisierung wurde in Untersuchungen der humanen Chemokinrezeptoren CXCR2, CXCR4 und CCR5 bestätigt (Fan *et al.*, 2001; Kraft *et al.*, 2001; Orsini *et al.*, 1999). Der Austausch der Dileuzinreste an Position 305/306 durch Alaninreste führte bei US28 zu einer um 30 % verminderten Internalisierung des Rezeptors nach 10 min. Nach 60 min war die Internalisierung jedoch identisch mit der des US28-wt-Rezeptors, was die Relevanz des C-terminalen Dileuzin-Motives für die Kinetik der US28-Internalisierung andeutet. Allerdings blieb die Kapazität der US28-Internalisierung von dem Austausch der Dileuzinreste unbeeinflusst.

Andere Endozytose-vermittelnde Motive wie ein C-terminales Dithreonin-Motiv im Gonadotropinrezeptor des Huhns (Pawson *et al.*, 2003) oder ein MxxxL-Motiv des Prostata-spezifischen-Membranantigens (Rajasekaran *et al.*, 2003) konnten in der Sequenz des US28-Rezeptors nicht identifiziert werden.

## 5.4. Die intrazelluläre Sortierung des US28-Rezeptors

Yxx $\phi$ -Motive befinden sich nicht nur in endozytierenden Rezeptoren wie dem Transferrinrezeptor, sondern auch in der Aminosäuresequenz lysosomaler Membranproteine wie Lamp 1, Lamp 2 oder CD63 (siehe Übersichten in Bonifacino und Dell'Angelica, 1999; Bonifacino und Traub, 2003). Da die Internalisierung des US28-Rezeptors unabhängig von den Yxx $\phi$ -Motiven war, könnten diese an der lysosomalen Sortierung des Rezeptors beteiligt sein. In diese Richtung weisen Untersuchungen an GFP-Fusionsproteinen des US28-Rezeptors, die eine Kolo-kalisation des US28-Rezeptors mit Lamp 1 und CD63 zeigten (Fraile-Ramos *et al.*, 2001; Waldhoer *et al.*, 2003).

Wie die Yxx $\phi$ -Motive sind auch Dileuzinmotive neben der Internalisierung auch an der endosomalen-lysosomalen Sortierung von Rezeptoren beteiligt. Kürzlich konnte ein Dileuzinmotiv des HIV-1 Gag-Vorläuferproteins pr55 identifiziert werden, das ähnlich dem Dileuzinmotiv des US28-Rezeptors eine schnelle Endozytose vermittelt. Darüber hinaus war das Dileuzinmotiv des HIV-Gag Proteins auch an dem Zusammenbau und der Freisetzung viraler Partikel beteiligt. Dabei wurde das Vorkommen dieses Proteins in multivesikulären Körperchen (MVB), die Bestandteil von späten Endosomen sind, als notwendiger Schritt für die Herstellung und Freisetzung viraler Partikel identifiziert. (Lindwasser und Resh, 2004). Als zellulärer Ursprung für die Lipidhülle des HCMV wurden ebenfalls die MVB vermutet (Fraile-Ramos *et al.*, 2002). Eine Analyse der HCMV-kodierten Chemokinrezeptoren UL33 und US27, sowie der Hüllproteine gB und gH zeigten ein Vorkommen dieser Proteine in diesen zellulären Strukturen sowie in freien Viruspartikeln (Fraile-Ramos *et al.*, 2002). Analog dazu wurde das Vorkommen von US28 in Viruspartikeln vermutet. Grundlage der Annahme waren elektronenmikroskopische Untersuchungen, die das Vorkommen des US28-Rezeptors in MVBs bestätigten (Fraile-Ramos *et al.*, 2001). Somit könnte das Dileuzinmotiv des US28-Rezeptors für seine Lokalisation in MVBs ähnlich der des HIV-Gag Proteins verantwortlich sein.

Ein weiterer Mechanismus der Proteinsortierung beruht auf der Ubiquitinierung zytoplasmatischer Lysinreste. Wie die Phosphorylierung oder Palmitoylierung ist die Ubiquitinierung eine reversible posttranslationale Modifikation. Zusätzlich wirkt die einfache Ubiquitinierung als ein regulatorischer Mechanismus und beeinflusst u.a. die Rezeptorinternalisierung sowie die Sortierung verschiedener Proteine in MVBs. Der Austausch der Lysinreste im C-Terminus des CXCR4-Rezeptors verhinderte zwar nicht die Internalisierung des Rezeptors, aber dessen lysosomalen Abbau (Marchese und Benovic, 2001). Auch in der Aminosäuresequenz des

US28-Rezeptors befinden sich intrazytoplasmatische Lysinreste, die entweder eine Internalisierung, die Sortierung des Rezeptors in MVB oder den lysosomalen Abbau beeinflussen könnten.

### **5.5. US28-vermittelt eine konstitutive Umlagerung von Arrestin-Molekülen in US28-freie Vesikel**

Arrestin-Moleküle sind sowohl an der Regulation der Desensitivierung von Rezeptoren, als auch an deren Internalisierung oder der Aktivierung intrazellulärer Signalwege (MAPK) beteiligt. Die Kotransfektion des US28-Rezeptors mit  $\beta$ -Arrestin-2-GFP führte zu einer Liganden-unabhängigen Umlagerung der Arrestin-Moleküle in intrazelluläre Vesikel. Dabei war auch der US28-Rezeptor Liganden-unabhängig in intrazellulären Vesikeln lokalisiert, ohne daß eine Kolokalisation beider Moleküle nachweisbar war. Weiterhin war die Internalisierung des US28-Rezeptors unabhängig von Arrestin-Molekülen. Ein ähnliches Phänomen konnte ebenfalls für den 5HT<sub>2A</sub>-Rezeptors beobachtet werden. Eine Stimulation des 5HT<sub>2A</sub>-Rezeptors mit seinem Liganden führte wie beim US28-Rezeptor zu einer Rekrutierung von Arrestin-Molekülen in vesikuläre Strukturen. Dabei konnte ebenfalls keine Kolokalisation zwischen Rezeptor und Arrestin-Molekülen beobachtet werden. Ferner war die Internalisierung des 5HT<sub>2A</sub>-Rezeptors wie bei US28 unabhängig von Arrestin-Molekülen (Bhatnagar *et al.*, 2001). Wie kann eine derartige Beobachtung erklärt werden? Zum einen könnte eine kurze Interaktion zwischen Rezeptor und Arrestin-Molekül an der Plasmamembran erfolgen. Danach würden Rezeptor und Arrestin-Moleküle in unterschiedliche Vesikel transportiert. In Übereinstimmung damit führte die Kotransfektion der phosphorylierungsdefizienten Mutante US28 S1-12A zu einem zytoplasmatischem Verteilungsmuster der  $\beta$ -Arrestin-Moleküle. Dies läßt eine direkte Interaktion des Rezeptors mit  $\beta$ -Arrestin vermuten, da die Phosphorylierung des C-Terminus die Affinität des Rezeptors für  $\beta$ -Arrestin-Moleküle erhöht. Die Transfektion der signalleitungsdefizienten Mutante US28 R129A führte ebenfalls zu keiner Umlagerung von  $\beta$ -Arrestin-Molekülen in vesikuläre Strukturen. Untersuchungen an CCR5-spezifischen Peptiden zeigten, daß Peptide des DRY-Motives eine stärkere Bindungsaffinität an  $\beta$ -Arrestin-Moleküle besitzen, als die von Peptiden des phosphorylierten C-Terminus. Deshalb wurde angenommen, daß das DRY-Motiv als weitere Bindungsstelle für Arrestin wirken kann (Hüttenrauch *et al.*, 2002). Somit könnte der Austausch des Argininrestes 129 ebenso wie der

Austausch der C-terminalen Phosphorylierungsstellen zu einer Zerstörung möglicher Bindungsstellen des US28-Rezeptors für  $\beta$ -Arrestin-Moleküle geführt haben.

Im Gegensatz zu dieser Vermutung legten Untersuchungen am 5 HT<sub>2A</sub>-Rezeptor nahe, daß die Umlagerung der Arrestin-Moleküle nicht durch eine direkte Bindung von Arrestinen mit dem DRY-Motiv des Rezeptors vermittelt wird, sondern durch eine vom DRY-Motiv-vermittelte Aktivierung von Signalkaskaden. Grundlage für diese Ansicht bildeten Experimente mit einem Antagonisten für den 5 HT<sub>2A</sub>-Rezeptor. Dieser verhinderte die Rezeptoraktivierung und Signalleitung sowie die Umlagerung von  $\beta$ -Arrestin-Molekülen, nicht aber die Internalisierung des Rezeptors (Bhatnagar *et al.*, 2001). Eine Aktivierung verschiedener Signalwege könnte analog dem 5HT<sub>2A</sub>-Rezeptor ebenso bei dem US28-Rezeptor für die konstitutive Umlagerung von  $\beta$ -Arrestin-Molekülen verantwortlich sein. Diese Annahme wird insbesondere von den hier gezeigten Ergebnissen gestützt, daß die R129A-Mutante signalleitungsdefizient ist und im Gegensatz zum wt-Rezeptor keine Umlagerung von Arrestin vermittelt. Weiterhin scheint der Austausch der Phosphorylierungsstellen am C-Terminus zu einer veränderten Kopplung an G-Protein-Untereinheiten zu führen (Mokros, 2004). Dadurch könnte eine veränderte Aktivierung von Signalwegen bewirkt werden, die die diffuse zytoplasmatische Verteilung der Arrestin-Moleküle durch die der US28 S1-12A Mutante erklärt. Ein Einsatz spezifischer Inhibitoren für verschiedene Signalwege könnte eine mögliche Beteiligung verschiedener Signalwege bei der Arrestin-Umlagerung aufklären helfen.

Eine weitere Erklärung für die unterschiedliche Lokalisation des Rezeptors und der  $\beta$ -Arrestin-Moleküle in den verschiedenen vesikulären Kompartimenten könnte durch eine direkte oder signalvermittelte Aktivierung eines zweiten unbekannten Rezeptors geliefert werden. So wird die Aktivität einiger GPCRs durch die Bildung von Homo- oder Heterodimeren reguliert. Beispielsweise ist die direkte molekulare Interaktion des Typ 2 GABA<sub>B</sub>-Rezeptors und des Typ 1 GABA<sub>B</sub>-Rezeptors notwendig, um ihren Transport an die Zelloberfläche zu gewährleisten (Jones *et al.*, 1998). Die molekulare Wechselwirkung des D<sub>2</sub>-Dopaminrezeptors und des Somatostatinrezeptors führte zu einer verstärkten Aktivität des Heterodimers (Rocheville *et al.*, 2000). Analog könnte direkt oder durch die konstitutive Aktivität des US28-Rezeptors die Aktivierung eines weiteren Rezeptors vermittelt werden. In der Folge würden beide Rezeptoren phosphoryliert, wodurch  $\beta$ -Arrestin-Moleküle an die Plasmamembran rekrutiert würden und der zweite unbekannte Rezeptor zusammen mit den  $\beta$ -Arrestin-Molekülen in Vesikeln internalisiert wird, die nicht den US28-Rezeptor enthalten. Einen solchen Rezeptor könnte CXCR4 darstellen, da CXCR4 endogen in den hier verwendeten HEK293A-Zellen exprimiert wird. Es wurde beobachtet, daß nach Kotransfektion des US28-

Rezeptors eine Abnahme von CXCR4 von der Zelloberfläche erfolgte, die aber nach Kointransfektion mit den US28-homologen humanen Chemokinrezeptoren CCR5 und CCR1 nicht festgestellt wurde (Pleskoff *et al.*, 1998). Diese Beobachtung wird auch als heterologe Desensitivierung bezeichnet. Ein weiteres Beispiel einer heterologen Desensitivierung wurde kürzlich für den konstitutiv-aktiven GPCR ORF 74 des Kaposi-Sarkom-assoziierten Herpesvirus beschrieben. Nach seiner Koexpression mit dem Thyrotropin-Releasing-Hormon- und m1-muscarinergen-Acetylcholinrezeptor wurde deren Fähigkeit, Kalziumsignale zu aktivieren, stark gehemmt (Lupu-Meiri *et al.*, 2001). Kürzlich konnte ebenso eine heterologe Desensitivierung für die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 beobachtet werden. Die vorherige oder simultane Stimulation mit den rezeptorspezifischen Liganden bewirkte eine Inhibition der Signalleitung, Adhäsion und Chemotaxis des jeweils anderen Rezeptors (Hecht *et al.*, 2003).

Was sind die möglichen Auswirkungen der konstitutiven Umlagerung von Arrestin-Molekülen in vesikuläre Strukturen? Zum einen könnte durch die konstitutive, durch US28-induzierte Arrestinumlagerung ein Mangel an freien Arrestin-Molekülen entstehen und somit die Desensitivierung weiterer GPCRs vermindern. Daraus würde eine Verstärkung oder Verlängerung verschiedener Signalwege resultieren. Grundlage für diese Vermutung bilden Untersuchungen an den Neurokininrezeptoren 1 und 3. Die Aktivierung des Neurokininrezeptors 1 führte zu einem verminderten Vorkommen freier Arrestin-Moleküle in der Zelle. Dadurch konnte die Desensitivierung des Neurokininrezeptors nicht länger gewährleistet werden und es folgte eine verlängerte Signalaktivierung des Rezeptors (Schmidlin *et al.*, 2002). Interessanterweise wird auch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch den humanen RANTES-Rezeptor CCR1 nach Koexpression des US28-Rezeptors signifikant verstärkt. Ob diese Hyperaktivierung aufgrund einer fehlenden Desensitivierung von CCR1 durch die Besetzung der Arrestin-Moleküle vermittelt wird, wurde nicht untersucht (Bakker *et al.*, 2004).

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß der US28-Rezeptor, obwohl er unabhängig von Arrestin-Molekülen internalisiert, eine Umlagerung von Arrestin in Endozytosevesikel bewirkt. Weiterhin wurde erstmalig gezeigt, daß US28 und Arrestin-Moleküle dabei nicht in denselben Vesikeln lokalisierten. Die molekularen Mechanismen dieser Umlagerung konnten noch nicht im Detail geklärt werden. Mögliche funktionelle Konsequenzen der Umlagerung von Arrestin-Molekülen können in einer Hyperaktivierung anderer Rezeptoren vermutet werden.

## 5.6. Strukturelle Voraussetzung des US28-Rezeptors für die Aktivierung intrazellulärer Signalwege

Der US28-Rezeptor vermittelt Liganden-unabhängig eine Aktivierung der Phospholipase C sowie der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und CREB (Casarosa *et al.*, 2001; Waldhoer *et al.*, 2002). Die Eigenschaft der konstitutiven Signalleitung teilt der US28-Rezeptor mit konstitutiv aktiven Mutanten humaner GPCRs. Gleichzeitig scheint die konstitutive Aktivität unter viralen Chemokinrezeptoren ein weit verbreitetes Merkmal zu sein. Besonders ausführlich wurden der ORF74 des Kaposi Sarkom-assoziierten Herpesvirus, UL33 des HCMV und seine homologen Rezeptoren im Maus- und Ratten-Zytomegalievirus, M33 und R33 untersucht.

Bei einigen der konstitutiv aktiven Mutanten humaner GPCRs oder viral kodierter Chemokinrezeptoren konnte das DRY-Motiv am Übergang der dritten Transmembrandomäne als eine strukturelle Voraussetzung für ihre konstitutive Aktivität identifiziert werden. Ein Schlüsselschritt für den Übergang des Rezeptors in einen aktiven Konformationszustand beinhaltet die Protonierung der Asparaginsäure innerhalb dieses Motivs (Gether, 2000). Dementsprechend führte der Austausch der Asparaginsäure bei dem  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor und CCR2 zu konstitutiv aktiven Rezeptormutanten, woraus geschlossen wurde, daß das DRY-Motiv für die Stabilisierung inaktiver Rezeptorkonformationen verantwortlich ist (Rasmussen *et al.*, 1999). Weiterhin besitzt der Kaposi-Sarkom-assoziierte Chemokinrezeptor ORF74 ein VRV-Motiv, wodurch seine konstitutive Aktivität vermittelt wird (Burger *et al.*, 1999).

Andererseits führte der Austausch des Argininrestes im konservierten DRY-Motiv zu einer Inaktivierung verschiedener Signalwege bei CCR5 und somit zu einer Hemmung der CCR5-vermittelten Chemotaxis (Gosling *et al.*, 1997). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, führte der Austausch des Argininrestes an Position 129 des konservierten DRY-Motives bei dem US28-Rezeptor zum Verlust der konstitutiven NF- $\kappa$ B-Aktivierung sowie der RANTES-abhängigen Aktivierung von MAPK. Zudem ist auch die konstitutive Aktivierung von PLC von der Expression des Arginin 129 abhängig (Waldhoer *et al.*, 2003). Somit konnte mit dem DRY-Motiv des US28-Rezeptors eine entscheidende strukturelle Voraussetzung für die Aktivierung Liganden- und konstitutiv-vermittelter Signalwege identifiziert werden.

## 5.7. Die Rolle des US28-Rezeptors während der HCMV-Infektion

Ein Mechanismus des HCMV dem Immunsystem zu entgehen beinhaltet eine Wechselwirkung viraler Genprodukte mit dem Chemokinsystem. Bereits der Kontakt einer Zelle mit dem HCMV ist ausreichend, um eine Ausschüttung des inflammatorischen Chemokins RANTES zu bewirken. Dennoch nimmt die Menge an RANTES aus der Umgebung infizierter Zellen im Verlauf der Infektion ab (Michelson *et al.*, 1997). Dieser Effekt ist abhängig von der Expression des US28-Rezeptors (Billstrom *et al.*, 1999; Bodaghi *et al.*, 1998). Als molekularer Mechanismus dieser effizienten Chemokinentfernung kann die Endozytose des US28-Rezeptors angesehen werden (Fraile-Ramos *et al.*, 2001).

Während dieser Arbeit konnten molekulare Details der US28-Endozytose aufgezeigt werden. Die Endozytose des US28-Rezeptors erfolgte vorwiegend über CCVs. Auf diesem Weg der Internalisierung wird bei einigen Rezeptoren nach der schnellen Endozytose ein schnelles Recycling des Rezeptors zurück an die Zelloberfläche ermöglicht. Anschließend steht der Rezeptor für eine erneute Chemokininternalisierung wieder zur Verfügung. Tatsächlich wurde das Recycling des US28-Rezeptors im Anschluß an seine Endozytose nachgewiesen (Fraile-Ramos *et al.*, 2001). Ferner stellte die konstitutive Phosphorylierung des US28-Rezeptors eine wichtige strukturelle Voraussetzung für ein effizientes Entfernen der inflammatorischen Chemokine dar. Neben der Internalisierung des US28-Rezeptors durch CCVs konnten Lipid-Rafts als weiterer Weg der Internalisierung identifiziert werden. Eine kürzlich veröffentlichte Studie schlug Lipid-Rafts als Bereiche für den HIV-Eintritt vor (Hug *et al.*, 2000). Damit könnte eine Lokalisation des US28-Rezeptors in diesem Kompartiment für seine HIV-Korezeptor-Funktion benötigt werden (Pleskoff *et al.*, 1997).

Weiterhin wurde vermutet, daß die durch den US28-Rezeptor-vermittelten proliferativen Signale (NF- $\kappa$ B und MAPK) Apoptose verhindern sowie an der Ausbildung der Latenz und Persistenz des HCMVs beteiligt sind (Beisser *et al.*, 2001; Beisser *et al.*, 2002; Billstrom Schroeder *et al.*, 2002). Während dieser Arbeit konnte das Arginin 129 im konservierten DRY-Motiv des US28-Rezeptors als notwendige strukturelle Grundlage für die durch den Rezeptor-vermittelte Aktivierung proliferativer Signalwege identifiziert werden.

In HCMV-infizierten Zellen werden die MAPK ERK1, ERK2 und p38 6-8h nach der Infektion aktiviert. Zusätzlich zu dieser frühen Phase der Aktivierung ist für die p38 MAPK ebenso eine Aktivierung 24-48h nach der HCMV-Infektion beschrieben werden. Diese Aktivierung der p38 korreliert mit einer zeitlichen Expression des US28-Rezeptors. Ebenfalls ist für den

US28-Rezeptor in unterschiedlichen Zellsystemen sowohl eine konstitutive als auch eine RANTES-vermittelte Aktivierung der p38 MAPK beschrieben worden (Miller *et al.*, 2003; Waldhoer *et al.*, 2002). Somit kann vermutet werden, daß der US28-Rezeptor für die späte Aktivierung der p38 MAPK in HCMV-infizierten Zellen verantwortlich sein könnte. In diesem Zusammenhang könnte eine in HCMV-infizierten Zellen beobachtete p38-abhängige Aktivierung des HSP27 von Interesse sein, da HSP27 einen Schutz vor Apoptose durch zellulären Streß vermittelt (Johnson *et al.*, 2000). Somit wurde vermutet, daß die Aktivierung der p38 MAPK dazu beiträgt, dem Virus eine vollständige Virusreplikation zu ermöglichen, bevor die Wirtszelle aufgrund des lytischen Zyklus abstirbt (Fortunato *et al.*, 2000).

## 5.8. Ausblick

Zusammenfassend beschreiben die hier vorgelegten Daten die molekularen Mechanismen US28-vermittelter Funktionen. Insbesondere stellt die Internalisierung des US28-Rezeptors über CCV die molekulare Grundlage zur Entfernung inflammatorischer Chemokine aus der Umgebung infizierter Zellen dar. Bei der im Zusammenhang mit der Endozytose beobachteten konstitutiven Umlagerung von Arrestin-Molekülen in vesikuläre Strukturen konnte ein molekularer Mechanismus bisher nicht gefunden werden. Weitere Untersuchungen in diesem Zusammenhang könnten eine Beeinflussung anderer GPCRs oder GPCR-vermittelter Signalleitung durch den US28-Rezeptor aufzeigen.

Tyrosin oder Dileuzin-basierende Sequenzmotive können neben der Internalisierung auch an einer intrazellulären Sortierung in MVBs oder späte Endosomen beteiligt sein. Mit Hilfe der in dieser Arbeit hergestellten Rezeptor-Varianten kann die Sortierung des US28-Rezeptors und damit ein möglicher später Einbau in die Virushülle untersucht werden.

Alle bisher diskutierten Funktionen des US28-Rezeptors, die mit der Ausbreitung des Virus, der Ausbildung der Latenz oder der Umgehung des Immunsystems im Zusammenhang stehen, basieren auf Daten, die *in vitro* aus verschiedenen Versuchen abgeleitet wurden. Für mögliche *in vivo* Versuche stehen derzeit keine Tiermodelle zur Verfügung, da die Zytomegalieviren der Maus oder Ratte keinen US28-homologen Chemokinrezeptor besitzen. Daher wäre eine Etablierung von Tiermodellen hilfreich, um das defizile Wechselspiel zwischen Virus und Wirt zu verstehen.





## Zusammenfassung

Humane Zytomegalieviren (HCMV) etablieren nach einer Primärinfektion eine lebenslange latente oder persistierende Infektion. Es wird allgemein angenommen, daß hieran die Manipulation der humanen Immunantwort durch das Virus beteiligt ist. In der jüngeren Vergangenheit wurden zahlreiche viruskodierte Genprodukte beschrieben, die eine immunmodulierende Funktion besitzen. Hierzu zählen die Hemmung von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und die Beeinträchtigung der Leukozytenwanderung durch die Hemmung des Chemokinsystems.

Für die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen wird die Präsentation viraler Peptide durch MHC-Klasse-I-Moleküle an der Oberfläche infizierter Zellen benötigt. Interessanterweise kodiert HCMV für vier Gene (US2, US3, US6 und US11), die eine Präsentation viraler Peptide auf der Oberfläche infizierter Zellen verhindern. Die Effizienz der US11-vermittelten Hemmung der T-Zell-Aktivierung wurde in einem rekombinanten Modell zur MHC-Klasse-I-vermittelten T-Zell-Aktivierung untersucht. Obwohl die Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle nach adenoviralem US11-Transfer in dendritische Zellen (DCs) um bis zu 60% vermindert war, konnte keine Hemmung der T-Zell-Proliferation beobachtet werden. Somit kann angenommen werden, daß neben der US11-Expression die Expression weiterer viraler Genprodukte für die Hemmung der T-Zell-Aktivierung in infizierten Zellen notwendig ist.

Mit US27, US28, UL33 und UL78 kodiert das HCMV für vier G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die Sequenzhomologien zu humanen Chemokin-Rezeptoren aufweisen. US28 ist der einzige funktionelle Rezeptor für die humanen inflammatorischen Chemokine MCP-1, MCP-3, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  sowie Fraktalkine. Nach Liganden-Stimulation vermittelt US28 die Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen und Fokalen Adhäsionskinasen. Daneben induziert die US28-Expression eine konstitutive Aktivierung der Phospholipase C, sowie der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und CREB. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe von positionsspezifischen Rezeptormutanten der Argininrest an Position 129 des konservierten DRY-Motivs als strukturelle Voraussetzung sowohl für die konstitutive als auch eine Liganden-vermittelte Aktivierung von Signalwegen identifiziert werden.

Ferner bewirkt die Expression des US28-Rezeptors eine Entfernung inflammatorischer Chemokine aus der Umgebung infizierter Zellen. Dies wurde als ein Mechanismus gedeutet dem Immunsystem zu entgehen, indem die Rekrutierung von Leukozyten an den Ort der Infektion verhindert wird. Molekulare Grundlage der Liganden-Depletion stellt die Endozytose des US28-Liganden-Komplexes dar. Die Endozytose sowie die geringe Expression des US28-Rezeptors an der Zelloberfläche sind abhängig von seiner C-terminalen Phosphorylierung,

was eine  $\beta$ -Arrestin-vermittelte Endozytose über den Clathrinweg andeutet. Es konnte gezeigt werden, daß der US28-Rezeptor zwar eine Umlagerung von  $\beta$ -Arrestin-Molekülen in vesikuläre Strukturen vermittelt, der Rezeptor jedoch unabhängig von Arrestin-Molekülen endozytiert wird. Zudem kommen beide Moleküle nicht gemeinsam in denselben Endozytosevesikeln vor. Die Endozytose des US28-Rezeptors war abhängig von der GTP-ase Dynamin. Sie bewirkt eine Abschnürung von Endozytosevesikeln sowohl auf dem Clathrin- als auch über den Lipid-Raft-abhängigen Weg. Die Beteiligung des Lipid-Raft-Weges an der US28-vermittelten Endozytose konnte durch eine verminderte Rezeptorendozytose nach Hemmung des Lipid-Raft-Weges und das Vorkommen des Rezeptors in der Detergenz-unlöslichen Zellfraktion gezeigt werden. Da die Hemmung des Clathrinweges durch Saccharose jedoch eine zweifach stärkere Verminderung der US28-Endozytose bewirkte, kann der Clathrin-abhängige Weg als der Hauptweg der US28-Endozytose angesehen werden. Gestützt wird diese Ansicht durch die Kolo-kalisation des US28-Rezeptors mit dem Clathrin-bindenden AP-2-Komplex in Endosomen. Mutagenesestudien des US28-Rezeptors deuten zudem an, daß ein C-terminales Dileuzin-Motiv nicht nur für die schnelle Rezeptorendozytose notwendig ist, sondern möglicherweise auch die direkte Kopplung an den AP-2-Komplex vermittelt.

## Summary

Primary infections of the ubiquitous human cytomegalovirus (HCMV) are followed by a life-long infection in the state of latency or persistence. It is believed that the virus employs a number of immunomodulatory mechanisms in order to establish latent infections. More recently, immunosubversive functions have been identified for several herpesvirus gene products. Among these are the inhibition of cytotoxic CD8<sup>+</sup> T-cells and the impairment of leukocyte migration by the neutralization of chemokines.

Activation of CD8<sup>+</sup> T-cells is triggered by the presentation of viral peptides by MHC class I molecules on the surface of infected cells. Interestingly, HCMV encodes four genes (US2, US3, US6 and US11) which are responsible for the abrogation of MHC class I restricted antigen presentation on the surface of infected cells. The potency of US11 to mediate the inhibition of T-cell activation was analysed in a recombinant model of MHC class I mediated T-cell activation. Surface expression of MHC class I molecules was reduced by 60 % after adenoviral transfer of US11 into murine dendritic cells. In contrast, there was no significant reduction in the capacity of the dendritic cells to induce T-cell proliferation, indicating that the expression of additional viral genes is required for the inhibitory effect on T-cell activation observed in HCMV infected cells.

HCMV encodes four putative G-protein coupled receptors with sequence homology to human chemokine receptors: US27, US28, UL33 and UL78. To date, only the US28 gene product has been characterized as a functional receptor for the inflammatory chemokines RANTES (CCL5), MCP-1 (CCL2), MCP-3 (CCL7), MIP-1 $\alpha$  (CCL3), MIP-1 $\beta$  (CCL4) and fractalkine (CX<sub>3</sub>CL1). Upon ligand stimulation US28 mediates the activation of mitogen-activated protein kinases and focal adhesion kinases. Additionally, expression of US28 results in constitutive activation of phospholipase C and the transcription factors NF- $\kappa$ B and CREB. By generating site directed receptor mutants it was shown that the arginine at position 129 which is located in the conserved “DRY-motif” represents a structural requirement for both the ligand-induced and the constitutive signaling by US28.

Moreover, it was suggested that the US28 dependent sequestration of chemokines from the environment of infected cells hinders leukocytes from the recruitment to sites of viral infection and therefore represents a mechanism of viral immune escape. A molecular mechanism for the ligand depletion may be provided by the endocytosis of US28-ligand complexes. Endocytosis and surface expression of US28 were regulated by C-terminal receptor phosphorylation, indicating  $\beta$ -arrestin mediated endocytosis on a clathrin dependent pathway. Confocal

microscopy studies revealed that US28 expression induced a redistribution of  $\beta$ -arrestin molecules into vesicular cytoplasmic structures. In contrast,  $\beta$ -arrestin was dispensable for the endocytosis of the US28 receptor. Furthermore, both of the molecules resided in distinct endocytic vesicles. However, US28 endocytosis was dependent on the small GTPase dynamin, which is responsible for the fission of endocytic vesicles both in the clathrin dependent and in the lipid raft dependent pathway. A role for the lipid raft dependent pathway in US28 endocytosis was shown by impaired receptor endocytosis after inhibition of the lipid raft pathway as well as by the presence of US28 in the detergent insoluble cell fraction. Since inhibition of the clathrin dependent pathway by succrose resulted in a two-fold stronger reduction of US28 endocytosis, the clathrin-dependent pathway can be considered as the major route of US28 endocytosis. This notion is supported by the endosomal colocalization of US28 together with the clathrin binding AP-2 complex. In addition, mutagenesis studies of the US28 receptor indicate that a C-terminal di-leucine-motif is not only required for rapid receptor endocytosis, but may also regulate a direct interaction with the AP-2 complex.

## 7. Literaturverzeichnis

- Ahn, K., A. Angulo, P. Ghazal, P.A. Peterson, Y. Yang, and K. Fruh. 1996. Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:10990-5.
- Ahn, K., A. Gruhler, B. Galocha, T.R. Jones, E.J. Wiertz, H.L. Ploegh, P.A. Peterson, Y. Yang, and K. Fruh. 1997. The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. *Immunity*. 6:613-21.
- Alcami, A. 2003. Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors. *Nat Rev Immunol*. 3:36-50.
- Anderson, R.G. 1998. The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem*. 67:199-225.
- Andre, P., R. Biassoni, M. Colonna, D. Cosman, L.L. Lanier, E.O. Long, M. Lopez-Botet, A. Moretta, L. Moretta, P. Parham, J. Trowsdale, E. Vivier, N. Wagtmann, and M.J. Wilson. 2001. New nomenclature for MHC receptors. *Nat Immunol*. 2:661.
- Aramori, I., S.S. Ferguson, P.D. Bieniasz, J. Zhang, B. Cullen, and M.G. Cullen. 1997. Molecular mechanism of desensitization of the chemokine receptor CCR-5: receptor signaling and internalization are dissociable from its role as an HIV-1 co-receptor. *Embo J*. 16:4606-16.
- Arvanitakis, L., E. Geras-Raaka, A. Varma, M.C. Gershengorn, and E. Cesarman. 1997. Human herpesvirus KSHV encodes a constitutively active G-protein- coupled receptor linked to cell proliferation. *Nature*. 385:347-50.
- Avalos, R.T., Z. Yu, and D.P. Nayak. 1997. Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal elements in influenza virus-infected cells. *J Virol*. 71:2947-58.
- Bacon, K.B., M.C. Szabo, H. Yssel, J.B. Bolen, and T.J. Schall. 1996. RANTES induces tyrosine kinase activity of stably complexed p125FAK and ZAP-70 in human T cells. *J Exp Med*. 184:873-82.
- Balkwill, F. 2003. Chemokine biology in cancer. *Semin Immunol*. 15:49-55.
- Bakker, R.A., P. Casarosa, H. Timmerman, M.J. Smit, and R. Leurs. 2004. Constitutively active Gq/11-coupled receptors enable signaling by co-expressed G(i/o)-coupled receptors. *J Biol Chem*. 279:5152-61. Epub 2003 Nov 10.
- Banks, T.A., and B.T. Rouse. 1992. Herpesviruses--immune escape artists? *Clin Infect Dis*. 14:933-41.
- Basta, S., W. Chen, J.R. Bennink, and J.W. Yewdell. 2002. Inhibitory effects of cytomegalovirus proteins US2 and US11 point to contributions from direct priming and cross-priming in induction of vaccinia virus-specific CD8(+) T cells. *J Immunol*. 168:5403-8.
- Beisser, P.S., L. Laurent, J.L. Virelizier, and S. Michelson. 2001. Human cytomegalovirus chemokine receptor gene US28 is transcribed in latently infected THP-1 monocytes. *J Virol*. 75:5949-57.
- Beisser, P.S., C.S. Goh, F.E. Cohen, and S. Michelson. 2002. Viral chemokine receptors and chemokines in human cytomegalovirus trafficking and interaction with the immune system. CMV chemokine receptors. *Curr Top Microbiol Immunol*. 269:203-34.
- Berger, E.A., P.M. Murphy, and J.M. Farber. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol*. 17:657-700.
- Berger, C., S. Xuereb, D.C. Johnson, K.S. Watanabe, H.P. Kiem, P.D. Greenberg, and S.R. Riddell. 2000. Expression of herpes simplex virus ICP47 and human cytomegalovirus US11 prevents recognition of transgene products by CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *J Virol*. 74:4465-73.

- Bergmann, M., L. Hart, M. Lindsay, P.J. Barnes, and R. Newton. 1998. IkappaBalpha degradation and nuclear factor-kappaB DNA binding are insufficient for interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha- induced kappaB-dependent transcription. Requirement for an additional activation pathway. *J Biol Chem.* 273:6607-10.
- Bernardini, G., D. Ribatti, G. Spinetti, L. Morbidelli, M. Ziche, A. Santoni, M.C. Capogrossi, and M. Napolitano. 2003. Analysis of the role of chemokines in angiogenesis. *J Immunol Methods.* 273:83-101.
- Bhatnagar, A., D.L. Willins, J.A. Gray, J. Woods, J.L. Benovic, and B.L. Roth. 2001. The dynamin-dependent, arrestin-independent internalization of 5-hydroxytryptamine 2A (5-HT2A) serotonin receptors reveals differential sorting of arrestins and 5-HT2A receptors during endocytosis. *J Biol Chem.* 276:8269-77.
- Bijlmakers, M.J., and M. Marsh. 2003. The on-off story of protein palmitoylation. *Trends Cell Biol.* 13:32-42.
- Billstrom, M.A., G.L. Johnson, N.J. Avdi, and G.S. Worthen. 1998. Intracellular signaling by the chemokine receptor US28 during human cytomegalovirus infection. *J Virol.* 72:5535-44.
- Billstrom, M.A., L.A. Lehman, and G. Scott Worthen. 1999. Depletion of extracellular RANTES during human cytomegalovirus infection of endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 21:163-7.
- Billstrom Schroeder, M., R. Christensen, and G.S. Worthen. 2002. Human cytomegalovirus protects endothelial cells from apoptosis induced by growth factor withdrawal. *J Clin Virol.* 25:S149-57.
- Biron, C.A., K.S. Byron, and J.L. Sullivan. 1989. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med.* 320:1731-5.
- Bjorklof, K., K. Lundstrom, L. Abuin, P.J. Greasley, and S. Cotecchia. 2002. Co- and posttranslational modification of the alpha(1B)-adrenergic receptor: effects on receptor expression and function. *Biochemistry.* 41:4281-91.
- Blanpain, C., V. Wittamer, J.M. Vanderwinden, A. Boom, B. Renneboog, B. Lee, E. Le Poul, L. El Asmar, C. Govaerts, G. Vassart, R.W. Doms, and M. Parmentier. 2001. Palmitoylation of CCR5 is critical for receptor trafficking and efficient activation of intracellular signaling pathways. *J Biol Chem.* 276:23795-804.
- Bodaghi, B., T.R. Jones, D. Zipeto, C. Vita, L. Sun, L. Laurent, F. Arenzana-Seisdedos, J.L. Virelizier, and S. Michelson. 1998. Chemokine sequestration by viral chemoreceptors as a novel viral escape strategy: withdrawal of chemokines from the environment of cytomegalovirus-infected cells. *J Exp Med.* 188:855-66.
- Bonifacino, J.S., and E.C. Dell'Angelica. 1999. Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J Cell Biol.* 145:923-6.
- Bonifacino, J.S., and L.M. Traub. 2003. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem.* 72:395-447.
- Braud, V.M., D.S. Allan, C.A. O'Callaghan, K. Soderstrom, A. D'Andrea, G.S. Ogg, S. Lazetic, N.T. Young, J.I. Bell, J.H. Phillips, L.L. Lanier, and A.J. McMichael. 1998. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature.* 391:795-9.
- Brodsky, F.M., C.Y. Chen, C. Knuehl, M.C. Towler, and D.E. Wakeham. 2001. Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17:517-68.
- Burger, M., J.A. Burger, R.C. Hoch, Z. Oades, H. Takamori, and I.U. Schraufstatter. 1999. Point mutation causing constitutive signaling of CXCR2 leads to transforming activity similar to Kaposi's sarcoma herpesvirus-G protein-coupled receptor. *J Immunol.* 163:2017-22.

- Casarosa, P., R.A. Bakker, D. Verzijl, M. Navis, H. Timmerman, R. Leurs, and M.J. Smit. 2001. Constitutive signaling of the human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28. *J Biol Chem.* 276:1133-7.
- Cavalli, V., M. Corti, and J. Gruenberg. 2001. Endocytosis and signaling cascades: a close encounter. *FEBS Lett.* 498:190-6.
- Chalmers, D.T., and D.P. Behan. 2002. The use of constitutively active GPCRs in drug discovery and functional genomics. *Nat Rev Drug Discov.* 1:599-608.
- Charest, P.G., and M. Bouvier. 2003. Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor carboxyl tail enhances beta-arrestin recruitment leading to efficient receptor endocytosis and ERK1/2 activation. *J Biol Chem.* 278:41541-51.
- Chen, C., V. Shahabi, W. Xu, and L.Y. Liu-Chen. 1998. Palmitoylation of the rat mu opioid receptor. *FEBS Lett.* 441:148-52.
- Chun, M., U.K. Liyanage, M.P. Lisanti, and H.F. Lodish. 1994. Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:11728-32.
- Cohen, G.B., T. Yang, P.R. Robinson, and D.D. Oprian. 1993. Constitutive activation of opsin: influence of charge at position 134 and size at position 296. *Biochemistry.* 32:6111-5.
- Cohen, G.B., R.T. Gandhi, D.M. Davis, O. Mandelboim, B.K. Chen, J.L. Strominger, and D. Baltimore. 1999. The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity.* 10:661-71.
- Collins, K.L., B.K. Chen, S.A. Kalams, B.D. Walker, and D. Baltimore. 1998. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature.* 391:397-401.
- Colonna, M., A. Moretta, F. Vely, and E. Vivier. 2000. A high-resolution view of NK-cell receptors: structure and function. *Immunol Today.* 21:428-31.
- Cosman, D., N. Fanger, L. Borges, M. Kubin, W. Chin, L. Peterson, and M.L. Hsu. 1997. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity.* 7:273-82.
- Damaj, B.B., S.R. McColl, K. Neote, N. Songqing, K.T. Ogborn, C.A. Hebert, and P.H. Naccache. 1996. Identification of G-protein binding sites of the human interleukin-8 receptors by functional mapping of the intracellular loops. *Faseb J.* 10:1426-34.
- Davis-Poynter, N.J., D.M. Lynch, H. Vally, G.R. Shellam, W.D. Rawlinson, B.G. Barrell, and H.E. Farrell. 1997. Identification and characterization of a G protein-coupled receptor homolog encoded by murine cytomegalovirus. *J Virol.* 71:1521-9.
- Dean, M., M. Carrington, C. Winkler, G.A. Huttley, M.W. Smith, R. Allikmets, J.J. Goedert, S.P. Buchbinder, E. Vittinghoff, E. Gomperts, S. Donfield, D. Vlahov, R. Kaslow, A. Saah, C. Rinaldo, R. Detels, and S.J. O'Brien. 1996. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science.* 273:1856-62.
- Dhami, G.K., P.H. Anborgh, L.B. Dale, R. Sterne-Marr, and S.S. Ferguson. 2002. Phosphorylation-independent regulation of metabotropic glutamate receptor signaling by G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem.* 277:25266-72.
- Doitsidou, M., M. Reichman-Fried, J. Stebler, M. Kopranner, J. Dorries, D. Meyer, C.V. Esguerra, T. Leung, and E. Raz. 2002. Guidance of Primordial Germ Cell Migration by the Chemokine SDF-1. *Cell.* 111:647-59.
- Downward, J. 1998. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol.* 10:262-7.



- Fan, G.H., W. Yang, X.J. Wang, Q. Qian, and A. Richmond. 2001. Identification of a motif in the carboxyl terminus of CXCR2 that is involved in adaptin 2 binding and receptor internalization. *Biochemistry*. 40:791-800.
- Fahnestock, M.L., J.L. Johnson, R.M. Feldman, J.M. Neveu, W.S. Lane, and P.J. Bjorkman. 1995. The MHC class I homolog encoded by human cytomegalovirus binds endogenous peptides. *Immunity*. 3:583-90.
- Farrens, D.L., C. Altenbach, K. Yang, W.L. Hubbell, and H.G. Khorana. 1996. Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science*. 274:768-70.
- Ferguson, S.S. 2001. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev*. 53:1-24.
- Ferguson, G., K.R. Watterson, and T.M. Palmer. 2002. Subtype-specific regulation of receptor internalization and recycling by the carboxyl-terminal domains of the human  $\alpha(1)$  and rat  $\alpha(3)$  adenosine receptors: consequences for agonist-stimulated translocation of arrestin3. *Biochemistry*. 41:14748-61.
- Fortunato, E.A., A.K. McElroy, I. Sanchez, and D.H. Spector. 2000. Exploitation of cellular signaling and regulatory pathways by human cytomegalovirus. *Trends Microbiol*. 8:111-9.
- Fraile-Ramos, A., T.N. Kledal, A. Pelchen-Matthews, K. Bowers, T.W. Schwartz, and M. Marsh. 2001. The human cytomegalovirus US28 protein is located in endocytic vesicles and undergoes constitutive endocytosis and recycling. *Mol Biol Cell*. 12:1737-49.
- Fraile-Ramos, A., A. Pelchen-Matthews, T.N. Kledal, H. Browne, T.W. Schwartz, and M. Marsh. 2002. Localization of HCMV UL33 and US27 in endocytic compartments and viral membranes. *Traffic*. 3:218-32.
- Fraile-Ramos, A., T.A. Kohout, M. Waldhoer, and M. Marsh. 2003. Endocytosis of the viral chemokine receptor US28 does not require beta-arrestins but is dependent on the clathrin-mediated pathway. *Traffic*. 4:243-53.
- Galbiati, F., B. Razani, and M.P. Lisanti. 2001. Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell*. 106:403-11.
- Gaidarov, I., Q. Chen, J.R. Falck, K.K. Reddy, and J.H. Keen. 1996. A functional phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate/phosphoinositide binding domain in the clathrin adaptor AP-2 alpha subunit. Implications for the endocytic pathway. *J Biol Chem*. 271:20922-9.
- Gaidarov, I., J.G. Krupnick, J.R. Falck, J.L. Benovic, and J.H. Keen. 1999. Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding. *Embo J*. 18:871-81.
- Gao, J.L., and P.M. Murphy. 1994. Human cytomegalovirus open reading frame US28 encodes a functional beta chemokine receptor. *J Biol Chem*. 269:28539-42.
- Geisler, C., J. Dietrich, B.L. Nielsen, J. Kastrop, J.P. Lauritsen, N. Odum, and M.D. Christensen. 1998. Leucine-based receptor sorting motifs are dependent on the spacing relative to the plasma membrane. *J Biol Chem*. 273:21316-23.
- Gether, U., S. Lin, P. Ghanouni, J.A. Ballesteros, H. Weinstein, and B.K. Kobilka. 1997. Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the beta2 adrenoceptor. *Embo J*. 16:6737-47.
- Gether, U. 2000. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev*. 21:90-113.
- Geva, A., T.B. Lassere, O. Lichtarge, S.K. Pollitt, and T.J. Baranski. 2000. Genetic mapping of the human C5a receptor. Identification of transmembrane amino acids critical for receptor function. *J Biol Chem*. 275:35393-401.

- Gillitzer, R., and M. Goebeler. 2001. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol.* 69:513-21.
- Gladow, M., W. Uckert, and T. Blankenstein. 2004. Dual T cell receptor T cells with two defined specificities mediate tumor suppression via both receptors. *Eur J Immunol.* 34:1882-91.
- Goodman, O.B., Jr., J.G. Krupnick, F. Santini, V.V. Gurevich, R.B. Penn, A.W. Gagnon, J.H. Keen, and J.L. Benovic. 1996. Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2- adrenergic receptor. *Nature.* 383:447-50.
- Goodrum, F.D., C.T. Jordan, K. High, and T. Shenk. 2002. Human cytomegalovirus gene expression during infection of primary hematopoietic progenitor cells: a model for latency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:16255-60. Epub 2002 Nov 27.
- Gosling, J., F.S. Montecarlo, R.E. Atchison, H. Arai, C.L. Tsou, M.A. Goldsmith, and I.F. Charo. 1997. Molecular uncoupling of C-C chemokine receptor 5-induced chemotaxis and signal transduction from HIV-1 coreceptor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:5061-6.
- Groarke, D.A., T. Drmota, D.S. Bahia, N.A. Evans, S. Wilson, and G. Milligan. 2001. Analysis of the C-terminal tail of the rat thyrotropin-releasing hormone receptor-1 in interactions and cointernalization with beta-arrestin 1-green fluorescent protein. *Mol Pharmacol.* 59:375-85.
- Gutkind, J.S. 2000. Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors. *Sci STKE.* 2000:RE1.
- Harder, T., and K. Simons. 1997. Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol.* 9:534-42.
- Harding, C.V., and E.R. Unanue. 1990. Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature.* 346:574-6.
- Haskell, C.A., M.D. Cleary, and I.F. Charo. 2000. Unique role of the chemokine domain of fractalkine in cell capture. Kinetics of receptor dissociation correlate with cell adhesion. *J Biol Chem.* 275:34183-9.
- Haucke, V., and M. Krauss. 2002. Tyrosine-based endocytic motifs stimulate oligomerization of AP-2 adaptor complexes. *Eur J Cell Biol.* 81:647-53.
- Hawtin, S.R., A.B. Tobin, S. Patel, and M. Wheatley. 2001. Palmitoylation of the vasopressin V1a receptor reveals different conformational requirements for signaling, agonist-induced receptor phosphorylation, and sequestration. *J Biol Chem.* 276:38139-46. Epub 2001 Jul 20.
- Hecht, I., L. Cahalon, R. HersHKoviz, A. Lahat, S. Franitza, and O. Lider. 2003. Heterologous desensitization of T cell functions by CCR5 and CXCR4 ligands: inhibition of cellular signaling, adhesion and chemotaxis. *Int Immunol.* 15:29-38.
- Heilker, R., U. Manning-Krieg, J.F. Zuber, and M. Spiess. 1996. In vitro binding of clathrin adaptors to sorting signals correlates with endocytosis and basolateral sorting. *Embo J.* 15:2893-9.
- Hengel, H., T. Flohr, G.J. Hammerling, U.H. Koszinowski, and F. Momburg. 1996. Human cytomegalovirus inhibits peptide translocation into the endoplasmic reticulum for MHC class I assembly. *J Gen Virol.* 77:2287-96.
- Henley, J.R., E.W. Krueger, B.J. Oswald, and M.A. McNiven. 1998. Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol.* 141:85-99.
- Hill, C.S., and R. Treisman. 1995. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell.* 80:199-211.
- Hirsch, E., V.L. Katanaev, C. Garlanda, O. Azzolino, L. Pirola, L. Silengo, S. Sozzani, A. Mantovani, F. Altruda, and M.P. Wymann. 2000. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science.* 287:1049-53.

- Horvath, R., J. Cerny, J. Benedik, Jr., J. Hokl, I. Jelinkova, and J. Benedik. 2000. The possible role of human cytomegalovirus (HCMV) in the origin of atherosclerosis. *J Clin Virol.* 16:17-24.
- Huard, B., and K. Fruh. 2000. A role for MHC class I down-regulation in NK cell lysis of herpes virus-infected cells. *Eur J Immunol.* 30:509-15.
- Hug, P., T. Lin, T. Korte, X. X., D.S. Dimitrov, J.M. Wang, A. Puri, and R. Blumenthal. 2000. Glycosphingolipids promote entry of a broad range of human immunodeficiency virus type 1 isolates into cell lines expressing CD4, CXCR4 and/or CCR5. *J Virol.* 74:6377-85.
- Hukovic, N., R. Panetta, U. Kumar, M. Rocheville, and Y.C. Patel. 1998. The cytoplasmic tail of the human somatostatin receptor type 5 is crucial for interaction with adenylyl cyclase and in mediating desensitization and internalization. *J Biol Chem.* 273:21416-22.
- Hüttenrauch, F., A. Nitzki, F.T. Lin, S. Honing, and M. Oppermann. 2002. Beta-arrestin binding to CC chemokine receptor 5 requires multiple C-terminal receptor phosphorylation sites and involves a conserved Asp-Arg-Tyr sequence motif. *J Biol Chem.* 277:30769-77.
- Jahn, G., S. Stenglein, S. Riegler, H. Einsele, and C. Sinzger. 1999. Human cytomegalovirus infection of immature dendritic cells and macrophages. *Intervirology.* 42:365-72.
- Johnson, R.A., S.M. Huong, and E.S. Huang. 2000. Activation of the mitogen-activated protein kinase p38 by human cytomegalovirus infection through two distinct pathways: a novel mechanism for activation of p38. *J Virol.* 74:1158-67.
- Jones, T.R., L.K. Hanson, L. Sun, J.S. Slater, R.M. Stenberg, and A.E. Campbell. 1995. Multiple independent loci within the human cytomegalovirus unique short region down-regulate expression of major histocompatibility complex class I heavy chains. *J Virol.* 69:4830-41.
- Jones, T.R., E.J. Wiertz, L. Sun, K.N. Fish, J.A. Nelson, and H.L. Ploegh. 1996. Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:11327-33.
- Jones, T.R., and L. Sun. 1997. Human cytomegalovirus US2 destabilizes major histocompatibility complex class I heavy chains. *J Virol.* 71:2970-9.
- Jones, K.A., B. Borowsky, J.A. Tamm, D.A. Craig, M.M. Durkin, M. Dai, W.J. Yao, M. Johnson, C. Gunwaldsen, L.Y. Huang, C. Tang, Q. Shen, J.A. Salon, K. Morse, T. Laz, K.E. Smith, D. Nagarathnam, S.A. Noble, T.A. Branchek, and C. Gerald. 1998. GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature.* 396:674-9.
- Jonjic, S., I. Pavic, P. Lucin, D. Rukavina, and U.H. Koszinowski. 1990. Efficacious control of cytomegalovirus infection after long-term depletion of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *J Virol.* 64:5457-64.
- Karre, K. 1997. How to recognize a foreign submarine. *Immunol Rev.* 155:5-9.
- Karre, K., and G. Schneider. 2000. Immunology. The footprint of a killer. *Nature.* 405:527-8.
- Kirchhausen, T., J.S. Bonifacino, and H. Riezman. 1997. Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 9:488-95.
- Kledal, T.N., M.M. Rosenkilde, F. Coulin, G. Simmons, A.H. Johnsen, S. Alouani, C.A. Power, H.R. Lutichau, J. Gerstoft, P.R. Clapham, I. Clark-Lewis, T.N. Wells, and T.W. Schwartz. 1997. A broad-spectrum chemokine antagonist encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Science.* 277:1656-9.
- Kledal, T.N., M.M. Rosenkilde, and T.W. Schwartz. 1998. Selective recognition of the membrane-bound CX3C chemokine, fractalkine, by the human cytomegalovirus-encoded broad-spectrum receptor US28. *FEBS Lett.* 441:209-14.

- Knall, C., and G.L. Johnson. 1998. G-protein regulatory pathways: rocketing into the twenty-first century. *J Cell Biochem Suppl.* 31:137-46.
- Kraft, K., H. Olbrich, I. Majoul, M. Mack, A. Proudfoot, and M. Oppermann. 2001. Characterization of sequence determinants within the carboxyl-terminal domain of chemokine receptor CCR5 that regulate signaling and receptor internalization. *J Biol Chem.* 276:34408-18.
- Kurzchalia, T.V., and R.G. Parton. 1999. Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol.* 11:424-31.
- Lamb, M.E., C. Zhang, T. Shea, D.J. Kyle, and L.M. Leeb-Lundberg. 2002. Human B1 and B2 bradykinin receptors and their agonists target caveolae-related lipid rafts to different degrees in HEK293 cells. *Biochemistry.* 41:14340-7.
- Lanier, L.L., B. Corliss, and J.H. Phillips. 1997. Arousal and inhibition of human NK cells. *Immunol Rev.* 155:145-54.
- Laporte, S.A., R.H. Oakley, J. Zhang, J.A. Holt, S.S. Ferguson, M.G. Caron, and L.S. Barak. 1999. The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:3712-7.
- Laporte, S.A., R.H. Oakley, J.A. Holt, L.S. Barak, and M.G. Caron. 2000. The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J Biol Chem.* 275:23120-6.
- Laporte, S.A., W.E. Miller, K.M. Kim, and M.G. Caron. 2002. beta-Arrestin/AP-2 interaction in G protein-coupled receptor internalization: identification of a beta-arrestin binding site in beta 2-adaptin. *J Biol Chem.* 277:9247-54.
- Lee, K.B., R. Pals-Rylaarsdam, J.L. Benovic, and M.M. Hosey. 1998. Arrestin-independent internalization of the m1, m3, and m4 subtypes of muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem.* 273:12967-72.
- Lehner, P.J., J.T. Karttunen, G.W. Wilkinson, and P. Cresswell. 1997. The human cytomegalovirus US6 glycoprotein inhibits transporter associated with antigen processing-dependent peptide translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:6904-9.
- Li, L., M.P. Haynes, and J.R. Bender. 2003. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:4807-12.
- Li, S., J. Couet, and M.P. Lisanti. 1996. Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J Biol Chem.* 271:29182-90.
- Lindwasser, O.W., and M.D. Resh. 2004. Human immunodeficiency virus type 1 Gag contains a dileucine-like motif that regulates association with multivesicular bodies. *J Virol.* 78:6013-23.
- Ljunggren, H.G., and K. Karre. 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today.* 11:237-44.
- Lu, Z.L., C.A. Curtis, P.G. Jones, J. Pavia, and E.C. Hulme. 1997. The role of the aspartate-arginine-tyrosine triad in the m1 muscarinic receptor: mutations of aspartate 122 and tyrosine 124 decrease receptor expression but do not abolish signaling. *Mol Pharmacol.* 51:234-41.
- Lupu-Meiri, M., R.B. Silver, A.H. Simons, M.C. Gershengorn, and Y. Oron. 2001. Constitutive signaling by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G-protein-coupled receptor desensitizes calcium mobilization by other receptors. *J Biol Chem.* 276:7122-8.
- Luster, A.D. 2002. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol.* 14:129-35.

- Luttrell, L.M., and R.J. Lefkowitz. 2002. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci.* 115:455-65.
- Ma, A.D., A. Metjian, S. Bagrodia, S. Taylor, and C.S. Abrams. 1998. Cytoskeletal reorganization by G protein-coupled receptors is dependent on phosphoinositide 3-kinase gamma, a Rac guanosine exchange factor, and Rac. *Mol Cell Biol.* 18:4744-51.
- Machold, R.P., E.J. Wiertz, T.R. Jones, and H.L. Ploegh. 1997. The HCMV gene products US11 and US2 differ in their ability to attack allelic forms of murine major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chains. *J Exp Med.* 185:363-6.
- Marchese, A., and J.L. Benovic. 2001. Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *J Biol Chem.* 276:45509-12.
- Marinissen, M.J., and J.S. Gutkind. 2001. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci.* 22:368-76.
- May, M.J., and S. Ghosh. 1998. Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today.* 19:80-8.
- Melkonian, K.A., A.G. Ostermeyer, J.Z. Chen, M.G. Roth, and D.A. Brown. 1999. Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J Biol Chem.* 274:3910-7.
- Mellado, M., J.M. Rodriguez-Frade, A. Aragay, G. del Real, A.M. Martin, A.J. Vila-Coro, A. Serrano, F. Mayor, Jr., and A.C. Martinez. 1998. The chemokine monocyte chemotactic protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor. *J Immunol.* 161:805-13.
- Mellado, M., J.M. Rodriguez-Frade, S. Manes, and A.C. Martinez. 2001. Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annu Rev Immunol.* 19:397-421.
- Michelson, S., P. Dal Monte, D. Zipeto, B. Bodaghi, L. Laurent, E. Oberlin, F. Arenzana-Seisdedos, J.L. Virelizier, and M.P. Landini. 1997. Modulation of RANTES production by human cytomegalovirus infection of fibroblasts. *J Virol.* 71:6495-500.
- Miller, W.E., D.A. Houtz, C.D. Nelson, P.E. Kolattukudy, and R.J. Lefkowitz. 2003. GRK phosphorylation and beta arrestin recruitment regulate the constitutive signaling activity of the human cytomegalovirus US28 GPCR. *J Biol Chem.* 31:31.
- Mocarski, E.S., and C.T. Courcelle. 2001. Cytomegaloviruses and Their Replication. In *Fields Virology*. Vol. 2. D.M. Knipe and P.M. Howley, editors. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA. 2629-2673.
- Moffett, S., B. Mouillac, H. Bonin, and M. Bouvier. 1993. Altered phosphorylation and desensitization patterns of a human beta 2- adrenergic receptor lacking the palmitoylated Cys341. *Embo J.* 12:349-56.
- Mokros, T., A. Rehm, J. Droese, M. Oppermann, M. Lipp, and U.E. Hopken. 2002. Surface expression and endocytosis of the human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 is regulated by agonist-independent phosphorylation. *J Biol Chem.* 277:45122-8.
- Mokros, T. 2004. Molekulare Mechanismen der Immunmodulation durch den Zytomegalievirus-kodierten Chemokinrezeptor US28. vollständige Version der Dissertation <http://www.diss.fu-berlin.de/2004/25/index.html>
- Moretta, A., C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, C. Cantoni, M.C. Mingari, R. Biassoni, and L. Moretta. 2001. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 19:197-223.
- Morris, A.J., and C.C. Malbon. 1999. Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev.* 79:1373-430.
- Mueller, A., E. Kelly, and P.G. Strange. 2002. Pathways for internalization and recycling of the chemokine receptor CCR5. *Blood.* 99:785-91.

- Mueller, S.G., J.R. White, W.P. Schraw, V. Lam, and A. Richmond. 1997. Ligand-induced desensitization of the human CXC chemokine receptor-2 is modulated by multiple serine residues in the carboxyl-terminal domain of the receptor. *J Biol Chem.* 272:8207-14.
- Murphy, P.M. 2001. Viral exploitation and subversion of the immune system through chemokine mimicry. *Nat Immunol.* 2:116-22.
- Naga Prasad, S.V., L.S. Barak, A. Rapacciuolo, M.G. Caron, and H.A. Rockman. 2001. Agonist-dependent recruitment of phosphoinositide 3-kinase to the membrane by beta-adrenergic receptor kinase 1. A role in receptor sequestration. *J Biol Chem.* 276:18953-9.
- Neote, K., D. DiGregorio, J.Y. Mak, R. Horuk, and T.J. Schall. 1993. Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor. *Cell.* 72:415-25.
- Oakley, R.H., S.A. Laporte, J.A. Holt, M.G. Caron, and L.S. Barak. 2000. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem.* 275:17201-10.
- Oakley, R.H., S.A. Laporte, J.A. Holt, L.S. Barak, and M.G. Caron. 2001. Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis\*. *J Biol Chem.* 276:19452-60.
- Odeberg, J., H. Browne, S. Metkar, C.J. Froelich, L. Branden, D. Cosman, and C. Soderberg-Naucler. 2003. The human cytomegalovirus protein UL16 mediates increased resistance to natural killer cell cytotoxicity through resistance to cytolytic proteins. *J Virol.* 77:4539-45.
- Ohno, H., J. Stewart, M.C. Fournier, H. Bosshart, I. Rhee, S. Miyatake, T. Saito, A. Gallusser, T. Kirchhausen, and J.S. Bonifacino. 1995. Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science.* 269:1872-5.
- Oppermann, M., M. Mack, A.E. Proudfoot, and H. Olbrich. 1999. Differential effects of CC chemokines on CC chemokine receptor 5 (CCR5) phosphorylation and identification of phosphorylation sites on the CCR5 carboxyl terminus. *J Biol Chem.* 274:8875-85.
- Orsini, M.J., J.L. Parent, S.J. Mundell, J.L. Benovic, and A. Marchese. 1999. Trafficking of the HIV coreceptor CXCR4. Role of arrestins and identification of residues in the c-terminal tail that mediate receptor internalization. *J Biol Chem.* 274:31076-86.
- Ovchinnikov Yu, A., N.G. Abdulaev, and A.S. Bogachuk. 1988. Two adjacent cysteine residues in the C-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitylated. *FEBS Lett.* 230:1-5.
- Owen, D.J., and P.R. Evans. 1998. A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytotic signals. *Science.* 282:1327-32.
- Palczewski, K., T. Kumasaka, T. Hori, C.A. Behnke, H. Motoshima, B.A. Fox, I. Le Trong, D.C. Teller, T. Okada, R.E. Stenkamp, M. Yamamoto, and M. Miyano. 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science.* 289:739-45.
- Pals-Rylaarsdam, R., V.V. Gurevich, K.B. Lee, J.A. Ptasienski, J.L. Benovic, and M.M. Hosey. 1997. Internalization of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. Arrestin-independent and -dependent pathways. *J Biol Chem.* 272:23682-9.
- Pamer, E., and P. Cresswell. 1998. Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol.* 16:323-58.
- Park, B., H. Oh, S. Lee, Y. Song, J. Shin, Y.C. Sung, S.Y. Hwang, and K. Ahn. 2002. The MHC class I homolog of human cytomegalovirus is resistant to down-regulation mediated by the unique short region protein (US)2, US3, US6, and US11 gene products. *J Immunol.* 168:3464-9.

- Parton, R.G. 2003. Caveolae--from ultrastructure to molecular mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:162-7.
- Pawson, A.J., S.R. Maudsley, J. Lopes, A.A. Katz, Y.M. Sun, J.S. Davidson, and R.P. Millar. 2003. Multiple determinants for rapid agonist-induced internalization of a nonmammalian gonadotropin-releasing hormone receptor: a putative palmitoylation site and threonine doublet within the carboxyl-terminal tail Are critical. *Endocrinology.* 144:3860-71.
- Penfold, M.E., D.J. Dairaghi, G.M. Duke, N. Saederup, E.S. Mocarski, G.W. Kemble, and T.J. Schall. 1999. Cytomegalovirus encodes a potent alpha chemokine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:9839-44.
- Percherancier, Y., T. Planchenault, A. Valenzuela-Fernandez, J.L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, and F. Bachelierie. 2001. Palmitoylation-dependent control of degradation, life span, and membrane expression of the CCR5 receptor. *J Biol Chem.* 276:31936-44.
- Pierce, K.L., L.M. Luttrell, and R.J. Lefkowitz. 2001. New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades. *Oncogene.* 20:1532-9.
- Pleskoff, O., C. Treboute, A. Brelot, N. Heveker, M. Seman, and M. Alizon. 1997. Identification of a chemokine receptor encoded by human cytomegalovirus as a cofactor for HIV-1 entry. *Science.* 276:1874-8.
- Pleskoff, O., C. Treboute, and M. Alizon. 1998. The cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 can enhance cell-cell fusion mediated by different viral proteins. *J Virol.* 72:6389-97.
- Pollok-Kopp, B., K. Schwarze, V.K. Baradari, and M. Oppermann. 2003. Analysis of ligand-stimulated CC chemokine receptor 5 (CCR5) phosphorylation in intact cells using phosphosite-specific antibodies. *J Biol Chem.* 278:2190-8.
- Prösch, S., W.D. Docke, P. Reinke, H.D. Volk, and D.H. Kruger. 1999. Human cytomegalovirus reactivation in bone-marrow-derived granulocyte/monocyte progenitor cells and mature monocytes. *Intervirology.* 42:308-13.
- Proudfoot, A.E., C.A. Power, C. Rommel, and T.N. Wells. 2003. Strategies for chemokine antagonists as therapeutics. *Semin Immunol.* 15:57-65.
- Qanbar, R., and M. Bouvier. 2003. Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. *Pharmacol Ther.* 97:1-33.
- Quinnan, G.V., Jr., N. Kirmani, A.H. Rook, J.F. Manischewitz, L. Jackson, G. Moreschi, G.W. Santos, R. Saral, and W.H. Burns. 1982. Cytotoxic t cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N Engl J Med.* 307:7-13.
- Raftery, M.J., M. Schwab, S.M. Eibert, Y. Samstag, H. Walczak, and G. Schonrich. 2001. Targeting the function of mature dendritic cells by human cytomegalovirus: a multilayered viral defense strategy. *Immunity.* 15:997-1009.
- Rajasekaran, S.A., G. Anilkumar, E. Oshima, J.U. Bowie, H. Liu, W. Heston, N.H. Bander, and A.K. Rajasekaran. 2003. A novel cytoplasmic tail MXXXL motif mediates the internalization of prostate-specific membrane antigen. *Mol Biol Cell.* 14:4835-45.
- Randolph-Habecker, J., B. Rahill, B. Torok-Storb, J. Vieira, P. Kolattukudy, B. Rovin, and D. Sedmak. 2002. The expression of the cytomegalovirus chemokine receptor homolog us28 sequesters biologically active cc chemokines and alters IL-8 production. *Cytokine.* 19:37.
- Rasmussen, S.G., A.D. Jensen, G. Liapakis, P. Ghanouni, J.A. Javitch, and U. Gether. 1999. Mutation of a highly conserved aspartic acid in the beta2 adrenergic receptor: constitutive activation, structural instability, and conformational rearrangement of transmembrane segment 6. *Mol Pharmacol.* 56:175-84.

- Rehm, A., and H.L. Ploegh. 1997. The betagamma subunits of heterotrimeric G proteins acquire detergent insolubility directly at the plasma membrane. *FEBS Lett.* 416:39-44.
- Reits, E.A., J.C. Vos, M. Gromme, and J. Neefjes. 2000. The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature.* 404:774-8.
- Resh, M.D. 1999. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1451:1-16.
- Reusser, P., S.R. Riddell, J.D. Meyers, and P.D. Greenberg. 1991. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood.* 78:1373-80.
- Riegler, S., H. Hebart, H. Einsele, P. Brossart, G. Jahn, and C. Sinzger. 2000. Monocyte-derived dendritic cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *J Gen Virol.* 81:393-9.
- Rochdi, M.D., and J.L. Parent. 2003. Galphaq-coupled receptor internalization specifically induced by Galphaq signaling. Regulation by EBP50. *J Biol Chem.* 278:17827-37. Epub 2003 Mar 7.
- Rocheville, M., D.C. Lange, U. Kumar, S.C. Patel, R.C. Patel, and Y.C. Patel. 2000. Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science.* 288:154-7.
- Rock, K.L., I.A. York, T. Saric, and A.L. Goldberg. 2002. Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv Immunol.* 80:1-70.
- Rodal, S.K., G. Skretting, O. Garred, F. Vilhardt, B. van Deurs, and K. Sandvig. 1999. Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell.* 10:961-74.
- Rodriguez-Frade, J.M., A.J. Vila-Coro, A. Martin, M. Nieto, F. Sanchez-Madrid, A.E. Proudfoot, T.N. Wells, A.C. Martinez, and M. Mellado. 1999. Similarities and differences in RANTES- and (AOP)-RANTES-triggered signals: implications for chemotaxis. *J Cell Biol.* 144:755-65.
- Roettger, B.F., R.U. Rentsch, D. Pinon, E. Holicky, E. Hadac, J.M. Larkin, and L.J. Miller. 1995. Dual pathways of internalization of the cholecystokinin receptor. *J Cell Biol.* 128:1029-41.
- Rolle, A., M. Mousavi-Jazi, M. Eriksson, J. Odeberg, C. Soderberg-Naucler, D. Cosman, K. Karre, and C. Cerboni. 2003. Effects of human cytomegalovirus infection on ligands for the activating NKG2D receptor of NK cells: up-regulation of UL16-binding protein (ULBP)1 and ULBP2 is counteracted by the viral UL16 protein. *J Immunol.* 171:902-8.
- Samson, M., F. Libert, B.J. Doranz, J. Rucker, C. Liesnard, C.M. Farber, S. Saragosti, C. Lapoumeroulie, J. Cognaux, C. Forceille, G. Muyldermans, C. Verhofstede, G. Burtonboy, M. Georges, T. Imai, S. Rana, Y. Yi, R.J. Smyth, R.G. Collman, R.W. Doms, G. Vassart, and M. Parmentier. 1996. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature.* 382:722-5.
- Sanderson, C.M., R. Avalos, A. Kundu, and D.P. Nayak. 1995. Interaction of Sendai viral F, HN, and M proteins with host cytoskeletal and lipid components in Sendai virus-infected BHK cells. *Virology.* 209:701-7.
- Santini, F., I. Gaidarov, and J.H. Keen. 2002. G protein-coupled receptor/arrestin3 modulation of the endocytic machinery. *J Cell Biol.* 156:665-76. Epub 2002 Feb 11.
- Sasaki, T., A. Suzuki, J. Sasaki, and J.M. Penninger. 2002. Phosphoinositide 3-kinases in immunity: lessons from knockout mice. *J Biochem (Tokyo).* 131:495-501.
- Schlaepfer, D.D., C.R. Hauck, and D.J. Sieg. 1999. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol.* 71:435-78.



- Schmidlin, F., O. Dery, N.W. Bunnett, and E.F. Grady. 2002. Heterologous regulation of trafficking and signaling of G protein-coupled receptors: beta-arrestin-dependent interactions between neurokinin receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:3324-9.
- Schmitz, A.A., E.E. Govek, B. Bottner, and L. Van Aelst. 2000. Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res.* 261:1-12.
- Schubert, U., L.C. Anton, J. Gibbs, C.C. Norbury, J.W. Yewdell, and J.R. Bennink. 2000. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature.* 404:770-4.
- Schüle, R., U. Liebenhoff, H. Müller, M. Birnbaumer, and W. Rosenthal. 1996. Properties of the human arginine vasopressin V2 receptor after site-directed mutagenesis of its putative palmitoylation site. *Biochem J.* 313:611-6.
- Schuler, T., and T. Blankenstein. 2002. Naive CD8(+) but not CD4(+) T cells induce maturation of dendritic cells. *J Mol Med.* 80:533-41. Epub 2002 Jun 19.
- Schust, D.J., D. Tortorella, J. Seebach, C. Phan, and H.L. Ploegh. 1998. Trophoblast class I major histocompatibility complex (MHC) products are resistant to rapid degradation imposed by the human cytomegalovirus (HCMV) gene products US2 and US11. *J Exp Med.* 188:497-503.
- Senechal, B., A.M. Boruchov, J.L. Reagan, D.N. Hart, and J.W. Young. 2004. Infection of mature monocyte-derived dendritic cells with human cytomegalovirus inhibits stimulation of T-cell proliferation via the release of soluble CD83. *Blood.* 103:4207-15. Epub 2004 Feb 12.
- Shen, X., S.B. Wong, C.B. Buck, J. Zhang, and R.F. Siliciano. 2002. Direct priming and cross-priming contribute differentially to the induction of CD8+ CTL following exposure to vaccinia virus via different routes. *J Immunol.* 169:4222-9.
- Shenoy, S.K., P.H. McDonald, T.A. Kohout, and R.J. Lefkowitz. 2001. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2- adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science.* 294:1307-13.
- Shenoy, S.K., and R.J. Lefkowitz. 2003. Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *J Biol Chem.* 278:14498-506. Epub 2003 Feb 6.
- Shih, W., A. Gallusser, and T. Kirchhausen. 1995. A clathrin-binding site in the hinge of the beta 2 chain of mammalian AP-2 complexes. *J Biol Chem.* 270:31083-90.
- Soderberg-Naucler, C., D.N. Streblow, K.N. Fish, J. Allan-Yorke, P.P. Smith, and J.A. Nelson. 2001. Reactivation of latent human cytomegalovirus in CD14(+) monocytes is differentiation dependent. *J Virol.* 75:7543-54.
- Stam, N.J., T.M. Vroom, P.J. Peters, E.B. Pastoors, and H.L. Ploegh. 1990. HLA-A- and HLA-B-specific monoclonal antibodies reactive with free heavy chains in western blots, in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections and in cryo-immuno-electron microscopy. *Int Immunol.* 2:113-25.
- Streblow, D.N., C. Soderberg-Naucler, J. Vieira, P. Smith, E. Wakabayashi, F. Ruchti, K. Mattison, Y. Altschuler, and J.A. Nelson. 1999. The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. *Cell.* 99:511-20.
- Su, R.C., S.K. Kung, J. Gariépy, B.H. Barber, and R.G. Miller. 1998. NK cells can recognize different forms of class I MHC. *J Immunol.* 161:755-66.
- Su, R.C., S.K. Kung, E.T. Silver, S. Lemieux, K.P. Kane, and R.G. Miller. 1999. Ly-49CB6 NK inhibitory receptor recognizes peptide-receptive H-2Kb. *J Immunol.* 163:5319-30.
- Sykulev, Y., M. Joo, I. Vturina, T.J. Tsomides, and H.N. Eisen. 1996. Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity.* 4:565-71.

- Tachibana, K., S. Hirota, H. Iizasa, H. Yoshida, K. Kawabata, Y. Kataoka, Y. Kitamura, K. Matsushima, N. Yoshida, S. Nishikawa, T. Kishimoto, and T. Nagasawa. 1998. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*. 393:591-4.
- Taylor-Wiedeman, J., J.G. Sissons, L.K. Borysiewicz, and J.H. Sinclair. 1991. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol*. 72:2059-64.
- Tohgo, A., E.W. Choy, D. Gesty-Palmer, K.L. Pierce, S. Laporte, R.H. Oakley, M.G. Caron, R.J. Lefkowitz, and L.M. Luttrell. 2003. The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J Biol Chem*. 278:6258-67.
- Tsao, P., T. Cao, and M. von Zastrow. 2001. Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 22:91-6.
- Ulbrecht, M., S. Martinozzi, M. Grzeschik, H. Hengel, J.W. Ellwart, M. Pla, and E.H. Weiss. 2000. Cutting edge: the human cytomegalovirus UL40 gene product contains a ligand for HLA-E and prevents NK cell-mediated lysis. *J Immunol*. 164:5019-22.
- Vales-Gomez, M., H. Browne, and H.T. Reyburn. 2003. Expression of the UL16 glycoprotein of Human Cytomegalovirus protects the virus-infected cell from attack by natural killer cells. *BMC Immunol*. 4:4.
- Vieira, J., T.J. Schall, L. Corey, and A.P. Geballe. 1998. Functional analysis of the human cytomegalovirus US28 gene by insertion mutagenesis with the green fluorescent protein gene. *J Virol*. 72:8158-65.
- Vila-Coro, A.J., J.M. Rodriguez-Frade, A. Martin De Ana, M.C. Moreno-Ortiz, A.C. Martinez, and M. Mellado. 1999. The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *Faseb J*. 13:1699-710.
- Vines, C.M., C.M. Revankar, D.C. Maestas, L.L. LaRusch, D.F. Cimino, T.A. Kohout, R.J. Lefkowitz, and E.R. Prossnitz. 2003. N-formyl peptide receptors internalize but do not recycle in the absence of arrestins. *J Biol Chem*. 278:41581-4.
- Waheed, A.A., and T.L. Jones. 2002. Hsp90 interactions and acylation target the G protein Galpha 12 but not Galpha 13 to lipid rafts. *J Biol Chem*. 277:32409-12. Epub 2002 Jul 12.
- Waldhoer, M., T.N. Kledal, H. Farrell, and T.W. Schwartz. 2002. Murine cytomegalovirus (CMV) M33 and human CMV US28 receptors exhibit similar constitutive signaling activities. *J Virol*. 76:8161-8.
- Waldhoer, M., P. Casarosa, M.M. Rosenkilde, M.J. Smit, R. Leurs, J.L. Whistler, and T.W. Schwartz. 2003. The carboxyl terminus of human cytomegalovirus-encoded 7 transmembrane receptor US28 camouflages agonism by mediating constitutive endocytosis. *J Biol Chem*. 278:19473-82.
- Wang, J.F., I.W. Park, and J.E. Groopman. 2000. Stromal cell-derived factor-1alpha stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C. *Blood*. 95:2505-13.
- Wiertz, E.J., T.R. Jones, L. Sun, M. Bogoy, H.J. Geuze, and H.L. Ploegh. 1996a. The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell*. 84:769-79.
- Wiertz, E.J., D. Tortorella, M. Bogoy, J. Yu, W. Mothes, T.R. Jones, T.A. Rapoport, and H.L. Ploegh. 1996b. Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature*. 384:432-8.
- Wyatt, R., and J. Sodroski. 1998. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science*. 280:1884-8.

- Yang, T.Y., S.C. Chen, M.W. Leach, D. Manfra, B. Homey, M. Wiekowski, L. Sullivan, C.H. Jenh, S.K. Narula, S.W. Chensue, and S.A. Lira. 2000. Transgenic expression of the chemokine receptor encoded by human herpesvirus 8 induces an angioproliferative disease resembling Kaposi's sarcoma. *J Exp Med*. 191:445-54.
- Yewdell, J., L.C. Anton, I. Bacik, U. Schubert, H.L. Snyder, and J.R. Bennink. 1999. Generating MHC class I ligands from viral gene products. *Immunol Rev*. 172:97-108.
- Yewdell, J.W., and J.R. Bennink. 2001. Cut and trim: generating MHC class I peptide ligands. *Curr Opin Immunol*. 13:13-8.
- Yoshimura, T., K. Matsushima, S. Tanaka, E.A. Robinson, E. Appella, J.J. Oppenheim, and E.J. Leonard. 1987. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84:9233-7.
- Zeng, Y., N. Tao, K.N. Chung, J.E. Heuser, and D.M. Lublin. 2003. Endocytosis of oxidized low density lipoprotein through scavenger receptor CD36 utilizes a lipid raft pathway that does not require caveolin-1. *J Biol Chem*. 278:45931-6. Epub 2003 Aug 28.

## **Danksagung**

Mein Dank gilt all denen, die mir bei der Durchführung der Dissertation behilflich waren:

bei meinen beiden Betreuern Herrn Dr. Armin Rehm und Frau Dr. Uta Höpken für die Bereitstellung des interessanten Themas und die herausragende Unterstützung in allen Belangen.

bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Uckert für die Vertretung dieser Arbeit am Fachbereich Biologie der Humbolt-Universität Berlin.

bei Herrn PD. Dr. Ralf Schüle für die Übernahme der Begutachtung.

bei Dr. Thilo Mokros für die beständige und erfolgreiche Kooperation in theoretischen und praktischen Belangen.

bei Herrn Prof. Dr. Ricardo Hermosilla für die überaus produktive Zusammenarbeit bei der Erstellung der mikroskopischen Aufnahmen.

bei Herrn PD. Dr. Martin Lipp für die Möglichkeit der Teilnahme an den Gruppenseminaren und das freizügige Angebot die Geräte seines Labors nutzen zu können.

bei Herrn Prof. Dörken für seine bereitwillige Unterstützung.

bei Herrn Dr. Thomas Schüler für die Einweisung in die Präparation von dendritischen Zellen.

bei Insa Lehmann, Dr. Tatiana Reimer, Dr. Arne Engelsberg und Constantin Rüder für die positive Arbeitsatmosphäre und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

bei meinen Kollegen aus der Gruppe Lipp, insbesondere Frank Wilde, Sven Golfier, Dr. Tobias Schultze, Antje Wegner, Dr. Phillipp Reiterer, Dr. Chrisian Ried, Ata-Ur-Rasheed, Jemina Benga und Nanthakumar Thirunarayanan für ihre Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

bei Frau Dagmar Breitfeld für die wertvollen Tips und Hinweise und bei Frau Daniela Keyner für die Hilfe in organisatorischen Belangen.

bei Steffi Noack für die bereitwillige Durchsicht des Manuskripts und ihre hilfreichen Anmerkungen und bei Nina für ihre Existenz.